

**Infrarotspektroskopische Untersuchung
zur Protein – Phospholipid Wechselwirkung
in biologischen Membranen
anhand von Modellsystemen**

**Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken
und der Einfluß verschiedener Kationen
in Abhängigkeit vom Wassergehalt**

Nikolaus Leberle

Disbui. München

1988

**INFRAROTSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG ZUR PROTEIN -
PHOSPHOLIPID WECHSELWIRKUNG IN BIOLOGISCHEN MEMBRANEN
ANHAND VON MODELLSYSTEMEN**

Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und der Einfluß verschiedener Kationen
in Abhängigkeit vom Wassergehalt

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von Nikolaus Leberle
München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Zundel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Knözinger

Tag der mündl. Prüfung: 26. 2.1988

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für physikalische Chemie der Universität München angefertigt. Die experimentellen Arbeiten hierzu wurden von September 1982 bis November 1986 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Zundel

der diese Arbeit anregte, danke ich besonders herzlich für seinen erfahrenen wissenschaftlichen Rat und seine stete Hilfsbereitschaft.

Weiterhin bedanke ich mich bei Doz. Dr. B. Brzezinski, Univ. Poznań (Polen), der mir bei der Synthese des Phosphorsäure - Esters behilflich war.

Dank gebührt auch meinen Kollegen von einst und jetzt, für die immer gute Zusammenarbeit in einer angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt mein Dank für die Bereitstellung der finanziellen Mittel.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.2.	Die Wasserstoffbrückenbindung	5
1.3.	Biologische Membranen	13
1.4.	Phospholipide	15
2.	Experimenteller Teil	17
2.1.	Synthese	17
2.2.	Herstellung der Ausgangssubstanzen	17
2.1.1.	O - Phospho - L - serin - P - ethylester x 2 H ₂ O (PSE)	17
2.1.2.	Poly - L - Histidin	19
2.1.3.	Poly - L - Lysin	19
2.1.4.	Salzlösungen	20
2.1.5.	Weitere Substanzen	21
2.2.	Präparation der Proben	22
2.2.1.	Probenträger	22
2.2.2.	Zentrifugation	24
2.3.	Aufnahme der IR - Spektren	25
2.3.1.	Küvette	25
2.3.2.	Trocknen und Hydratisieren der Filme	28
2.3.3.	Spektrograph	29
2.3.4.	Untersuchte Systeme	30

2.3.5.	Aufgabenstellung	31
3.	Ergebnisse und Diskussion	32
3.1.1.	PSE	37
3.1.2.	PSE deuteriert	49
3.2.	Übersicht über die PSE - Systeme	55
3.3.1.	PSE + LiOH	59
3.3.2.	PSE + NaOH	66
3.3.3.	PSE + KOH	69
3.3.4.	PSE + Ca(OH)_2	73
3.4.	Übersicht über die PSE + Kationen Systeme	77
3.5.	Konformation von Polyaminosäuren	82
3.6.1.	Poly - L - Histidin + PSE	84
3.6.2.	Poly - L - Histidin + PSE + LiOH	87
3.6.3.	Poly - L - Histidin + PSE + NaOH	89
3.6.4.	Poly - L - Histidin + PSE + KOH	91
3.6.5.	Poly - L - Histidin + PSE + Ca(OH)_2	93
3.7.	Übersicht über die Poly - L - Histidin - Systeme	95
3.8.1.	Poly - L - Lysin + PSE	99
3.8.2.	Poly - L - Lysin + PSE + LiOH	103
3.8.3.	Poly - L - Lysin + PSE + NaOH	107
3.8.4.	Poly - L - Lysin + PSE + KOH	110
3.8.5.	Poly - L - Lysin + PSE + Ca(OH)_2	113
3.9.	Übersicht über die Poly - L - Lysin - Systeme	117

3.10.	Vergleich mit den Poly - L - Glutaminsäure Systemen	125
4.	Zusammenfassung	126
5.	Literaturverzeichnis	130

Im Text häufig verwendete Abkürzungen:

PSE	O - Phospho - L - serin - P - ethylester x 2 H ₂ O
(His) _n	Poly - L - Histidin
(Lys) _n	Poly - L - Lysin
PS	Phosphatidylserin
PE	Phosphatidylethanolamin
PC	Phosphatidylcholin
%LF	rel. Luftfeuchtigkeit (bei 25 °C) in %

Molekülschwingungen:

ν	Streckschwingung
δ	Deformationsschwingung (in plane)
γ	Deformationsschwingung (out of plane)

1. Einleitung

Jeder lebende Organismus ist dadurch charakterisiert, daß er sich durch eine Molekülschicht, die als Wand angesehen werden kann, von seiner Umgebung abgrenzt. Diese physikalische Abgrenzung, eine Membran von etwa 90 Å Dicke, muß eine selektive Permeabilität für bestimmte Substanzen aufweisen, sodaß ein Stofftransport in beiden Richtungen stattfinden kann.

Chemische und morphologische Untersuchungen unterstützten die Annahme, daß alle Membranen eine gemeinsame Grundstruktur haben. Fast ausnahmslos enthalten alle Membranen Proteine und wechselnde Mengen an polaren Lipiden, auch Kohlenhydrate lassen sich gewöhnlich nachweisen.

Die Phospholipidkomponente der biologischen Membran besteht nicht nur aus einer Lipidspezies, sondern aus einer Mischung verschiedener Phospholipide, die sich sowohl in der Fettsäurezusammensetzung als auch in der Struktur der Kopfgruppe unterscheiden.

In den frühesten Untersuchungen war man hauptsächlich damit beschäftigt, Membranen unterschiedlicher Art mit physikalischen Methoden aufzutrennen, um so den prozentualen Gehalt an Protein, Lipiden und anderen Bestandteilen zu ermitteln. Die chemische Struktur der Kopfgruppen und der Fettsäurereste der Lipide wurden bestimmt. Aus den abgetrennten Phospholipiden wiederum ließen sich künstliche Membranen mit definierter Kopfgruppe und Lipidanordnung herstellen, die es ermöglichten, die physikalischen Eigenschaften biologischer Membranen zu untersuchen.

Ein erstes Modell für die Anordnung der Lipidmoleküle, das Doppelschichtmodell, stammt von Gorter und Grendel aus dem Jahr 1925 (Lit. 1). Im Laufe der Zeit wurden, gestützt auf neuere Untersuchungen und Erkenntnisse, weitere Membranmodelle vorgestellt. Heute allgemein als beste Näherung anerkannt ist das "Flüssig - Mosaik" - Modell von Singer und Nicolson (Lit. 2).



Obwohl schon F.O. Schmitt um 1940 klar den quasi flüssigen Charakter der Fettsäurereste in den Lipiddoppelschichten erkannt hatte, wurden bis Ende der sechziger Jahre die Doppelschichtmodelle meist als statische Strukturen betrachtet.

Erst die Anwendung von spektroskopischen Techniken, mit denen die Kinetik molekularer und intramolekularer Bewegung beobachtet werden kann, änderte die Auffassung über die Membranstruktur grundlegend. Der reversible Übergang der Kohlenwasserstoffketten von der Gel- in eine flüssig-kristalline Phase, abhängig von der Temperatur, war entdeckt worden.

Kalorimetrische Untersuchungen wurden durchgeführt und die jeweilige Temperatur des Phasenübergangs ermittelt (Lit. 3).

Mithilfe der ESR- bzw. der NMR-Spektroskopie erhielt man Rotationsrelaxationszeiten, die mit der Viskosität der Membran korreliert werden konnten, auch die Messung der lateralen Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide war möglich.

Es wurde nachgewiesen, daß in der Doppelschicht eine asymmetrische Lipidverteilung vorliegt, wobei polarere Kopfreionen eher der Außenseite der Membran, weniger polare der Innenseite zugewandt sind (Lit. 4,5).

Ein flip-flop, d.h. ein Lipidaustausch zwischen Außen- und Innenseite, erfolgt dabei nur sehr langsam (Lit. 6).

Besonders auffallend unterscheiden sich die künstlichen von den biologischen Membranen durch ihren spezifischen elektrischen Widerstand. Dieser war bei den Modellmembranen (ca. $10^8 \Omega \cdot \text{cm}$) etwa 10^6 mal höher als bei Biomembranen. Durch Zugabe von bestimmten Proteinen, Oligopeptiden oder ähnlichen Molekülen konnte er jedoch in den Bereich der Biomembranen gesenkt werden.

Man folgerte daraus, daß die Anwesenheit von Proteinen zum Transport von geladenen Molekülen und Ionen durch die Membran erforderlich ist.

Membranebundene Proteine wirken oft als Rezeptoren für Hormone bzw. Neurotransmitter, sie werden dazu möglicherweise erst durch Wechselwirkung mit Phospholipiden aktiviert (Lit. 7,8). Allerdings scheint die Aktivierung der Proteine unspezifisch zu sein, es ist nur eine Umgebung mit bestimmten physikalischen Eigenschaften erforderlich.

Verschiedene Autoren untersuchten den Kationeneinfluß auf biologische Membranen (Lit. 9 - 11) und beobachteten dabei eine Wechselwirkung sowohl mit den Phospholipiden als auch mit den Proteinen.

Bei Adsorption von Kationen an biologische Membranen fand man Bindungskonstanten, die sich für verschiedene Kationen um Größenordnungen unterscheiden (Lit. 12).

Nahezu jeder Organismus reichert in seinem Innern Kaliumionen an und eliminiert Natriumionen.

Lithiumionen sind durch ihre psychopharmakologische Wirkung bekannt (Lit 13).

Calcium- und Magnesiumionen spielen bei der Auslösung zahlreicher biologischer Effekte eine wichtige Rolle.

Bei bisherigen Untersuchungen der Phospholipide (Lit. 14) wurde der Einfluß von Kationen auf die Konformation des Fettsäurerestes und der Phosphatgruppe sowie auf den Wassergehalt der Membran ermittelt.

Ziel meiner Arbeit war, an einem Modellsystem die Protein - Phospholipid Wechselwirkung infrarotspektroskopisch zu untersuchen. Insbesondere die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Phospholipiden und polaren Protein-seitengruppen sollte ergründet werden.

Da hierbei besonders die Kopfgruppe des Phospholipids von Interesse ist, wurde ein Modellmolekül für Phosphatidylserin, O - Phospho - L - serin - P - ethylester, synthetisiert.

Der Diacylglycerin - Rest des Phospholipids ist in diesem Fall durch eine Ethylgruppe ersetzt.

Abgesehen von der Reduzierung der Infrarotbanden, was die Auswertung der Spektren vereinfachen sollte, versprach man sich davon auch Vorteile bei der experimentellen Durchführung der Versuche. Unerwünschte Effekte wie Micellenbildung in wäßriger Lösung und die dadurch behinderte Zugänglichkeit der Phospholipid - Kopfgruppe für Kationen bzw. Proteine wurden ausgeschlossen.

Bei Untersuchungen an einem ähnlichen Modellsystem, O - Phospho - L - serin - P - methylester, konnte man in wäßriger Lösung in Abhängigkeit vom pH - Wert die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen Phosphat - und Carbonsäuregruppierung beobachten (Lit. 15).

Außerdem stellte man fest, daß die Kopfgruppe von Phosphatidylserin sehr viel starrer als die von anderen Lipiden ist. Man vermutete, daß starke elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken zwischen benachbarten PS - Molekülen die Ursache dafür ist (Lit. 16).

In biologischen Membranen ist eine Protonenleitung beim Ablauf enzymatischer Prozesse von Bedeutung. Die Funktion der ATPase beispielsweise erfordert einen Protonentransport vom Protonen freisetzenden Zentrum an der Membran zur ATPase. Es erhebt sich die Frage, ob die Protonen dahin an der Oberfläche der Membran oder in der wäßrigen Lösung außerhalb der Membran transportiert werden (Lit. 17,18).

Zur Untersuchung der Protein - Phospholipid Wechselwirkung wählte man als Modellsubstanz für Proteine die Polypeptide Poly - Lysin (L - Lys)_n bzw. Poly - Histidin (L - His)_n.

Im Rahmen einer Diplomarbeit in unserem Arbeitskreis wurde bereits Poly - Glutaminsäure (L - Glu)_n mit derselben Zielsetzung untersucht (Lit. 19).

Die Wechselwirkung von einer sauren, neutralen oder basischen Proteinseiten-
gruppe mit einem Phospholipidmolekül konnte so bei verschiedenem Wassergehalt
modellhaft untersucht werden.

Um den Einfluß von Lithium - , Natrium - , Kalium - und Calciumionen zu
ermitteln, versetzte man die Modellsysteme mit einer definierten Menge des
Hydroxids des entsprechenden Kations.

1.2. Die Wasserstoffbrückenbindung

Eine Wasserstoffbrücke ist eine relativ schwache chemische Bindung zwischen einem Wasserstoffbrückendonator $A-H$ und einem Akzeptor B .

Mit einer freien Bindungsenergie von etwa -10 bis -20 kJ/Mol läßt sie sich zwischen der schwachen van der Waals Wechselwirkung (-1 bis -3 kJ/Mol) und der kovalenten Bindung einordnen (Lit. 20).

Der Begriff "Wasserstoffbrückenbindung" wurde 1920 von Latimer und Rodebush (Lit. 21) postuliert, als sie die zwischenmolekularen Wechselwirkungen bei Flüssigkeiten untersuchten. Trotz geringer Bindungsenergie haben Wasserstoffbrücken einen gravierenden Einfluß auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften vieler Systeme, so werden beispielsweise die Schmelz- und Siedepunkterhöhung und auch die Dichteanomalie von Wasser durch sie verursacht.

Die Infrarot-Spektroskopie hat sich als besonders geeignete Methode zur Untersuchung von Wasserstoffbrücken erwiesen (Lit. 22). Es werden Molekülschwingungen beobachtet, die sich charakteristisch bestimmten Bindungen und chemischen Gruppierungen zuordnen lassen.

Wasserstoffbrücken sind im IR gekennzeichnet durch:

Verschiebung der Streckschwingung $\nu(A-H)$ des Brückenprotons zu kleineren Wellenzahlen

Starke Zunahme der Extinktion dieser Bande

Zunahme der Halbwertsbreite

Starke Abhängigkeit der Bandenlage und des Extinktionskoeffizienten von der Temperatur und der Konzentration (Lit. 23,24)

Auftreten einer kontinuierlichen Absorption, die sich bandenartig mit teilweise großer Intensität (wäßrige Säurelösungen) dem Spektrum überlagert (Lit. 25-27)

Die letztgenannte Eigenschaft findet sich nicht bei allen Wasserstoffbrücken, sie tritt vielmehr nur bei Systemen mit großer Protonenpolarisierbarkeit, wie später näher erläutert, auf.

Man versuchte, die so gewonnenen IR - spektroskopischen Daten mit physikalisch - chemischen Eigenschaften der Substanzen zu korrelieren.

Beispiele hierfür sind die Korrelation der Bandenverschiebung $\Delta\nu(\text{A-H})$ mit der Enthalpie ΔH der Brückenbindung (Lit. 28) oder die Korrelation $\Delta\nu(\text{A-H})$ mit der Brückenlänge, wie sie aus röntgenkristallographischen Daten gewonnen wurde (Lit. 29).

Länge der Wasserstoffbrücken in Proteinen (Kristalle):

O - H ... O	2.6 - 2.9 Å
N - H ... O	2.8 - 3.2 Å
N - H ... N	2.7 - 2.9 Å

(Lit. 30)

Energetisch am günstigsten ist eine lineare Anordnung der Wasserstoffbrückenatome. Davon abweichend findet man z.B. bei dimeren Carbonsäuren auch gewinkelte Systeme.

Probleme bei der Auswertung bereitet die Wechselwirkung der Wasserstoffbrücke mit der Umgebung. In Flüssigkeiten bilden sich, wie man aus anderen Untersuchungen weiß, häufig keine definierten Donor - Akzeptor Komplexe, sondern Cluster verschiedenster Größe, wodurch eine Zuordnung der Absorptionsbanden erschwert wird.

Beim Versuch, die übermäßige Bandenbreite theoretisch zu erklären, kam man schon in den fünfziger Jahren zu der Erkenntnis, daß es sich bei manchen Wasserstoffbrücken um Doppelminimum - Potentiale handeln könnte (Lit. 31,32).

Auch die anormale Protonenleitfähigkeit in wäßrigen Säurelösungen (Grotthus - Leitfähigkeit) könnte auf einer solchen Potentialform (der Wasserstoffbrücken) beruhen (Lit. 33).

Im Fall des Doppelminimumpotentials verursacht die Wasserstoffbrücke viele IR - Übergänge, die sich empfindlich in Abhängigkeit von einem elektrischen Feld verschieben (Lit 34). Folgende Wechselwirkungen der Wasserstoffbrücke mit ihrer Umgebung treten auf:

Wechselwirkung der Wasserstoffbrücke mit lokalen Feldern aus der Umgebung. Hierbei ist die Dipol - Relaxation der Umgebung von besonderer Bedeutung, denn in der Umgebung der Wasserstoffbrücke wird durch Induktion eine höhere Ordnung erzeugt (Reaktionsfeld)

Elektromagnetische Kopplung von Übergängen in der Wasserstoffbrücke, bedingt durch die großen Übergangsmomente, mit Übergängen in der Umgebung.

Dispersionswechselwirkung

Wechselwirkung von benachbarten Wasserstoffbrücken, korrelierte Protonenbewegung

Theoretische Untersuchungen befassen sich mit dem Protonenpotential der Wasserstoffbrücke. Dieses wird von der Natur der Donor - bzw. der Akzeptorgruppe und insbesondere durch die Einflüsse der Umgebung geprägt.

Man unterscheidet vier verschiedene Potentialformen (Abb. 1):

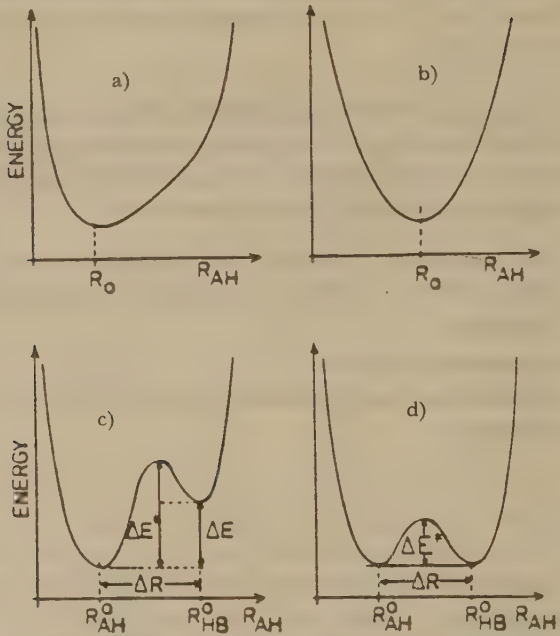


Abb. 1:

Einfachminimum: a) unsymmetrisch b) symmetrisch

Doppelminimum: c) unsymmetrisch d) symmetrisch

(entnommen aus Lit. 35)

Theorie:

Es sei eine Wasserstoffbrücke mit symmetrischem Doppelminimum - Potential, wie in Abb. 1d) zu sehen, betrachtet. Hier fluktuiert im isolierten H_5O_2^+ System ein Proton zwischen zwei Wassermolekülen.



Im Doppelminimumpotential liegen die Energieniveaus paarweise vor (siehe Abb. 2). Der Grundzustand ist in eine symmetrische Ψ_{0+} und eine antisymmetrische Ψ_{0-} Komponente (Abb. 3) aufgespalten (Lit. 36).

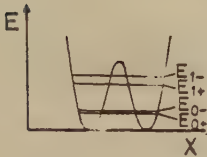


Abb. 2:
Energieniveaus im symmetrischen
Doppelminimumpotential

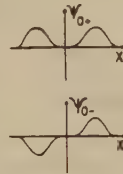


Abb. 3:
Eigenfunktionen der
Niveaus E_{0+} und E_{0-}

Der Energieunterschied zwischen E_{0+} und E_{0-} ist bei Raumtemperatur sehr klein, sodaß beide Zustände annähernd gleich besetzt sind. Da $(E_1 - E_0)$ sehr viel größer als kT ist, kann die Besetzung der höheren Zustände vernachlässigt werden.

Der Einfluß der Umgebung (man vergleiche die oben beschriebenen Effekte) wird im theoretischen Modell durch Überlagerung des Potentials mit einem statischen elektrischen Feld simuliert (Lit. 37).

Ausgehend vom ungestörten Doppelminimum - Potential wurden mithilfe der Tunnelapproximation durch Beimischung des Zustands Ψ_{0-} zum Zustand Ψ_{0+} die Energieniveaus und das Protonenpotential des Doppelminimums bei überlagertem elektrischen Feld berechnet.

Man fand heraus, daß ein relativ schwaches Feld ausreicht, das Protonenpotential zu verändern und somit die Energieniveaus zu verschieben (Abb. 4 und 5).

Dies bedeutet, daß bereits durch sehr schwache elektrische Felder der Umgebung eine große Ladungsverschiebung in der Wasserstoffbrücke induziert wird, was sich in einer unsymmetrischen Ladungsverteilung (Protontransfer - Gleichgewicht) der Wasserstoffbrücken äußert.

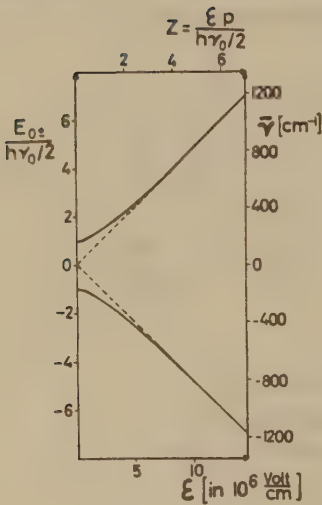


Abb. 4:
Verschiebung der Niveaus E_{0+} und E_{0-}
durch ein äußeres elektrisches Feld
(entnommen aus Lit. 37)

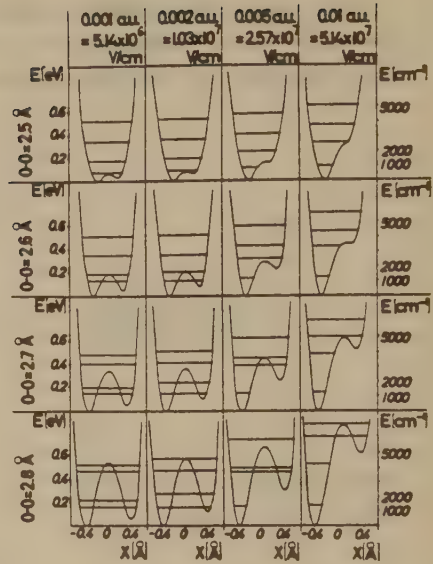


Abb. 5:
Einfluß elektrischer Felder
auf den Potentialverlauf
der Wasserstoffbrücke
im $H_5O_2^+$ System
(entnommen aus Lit. 38)

Daraus resultiert eine sehr hohe Protonenpolarisierbarkeit, die die üblichen Elektronenpolarisierbarkeiten (H^+ im Netzwerk der Hydratstruktur mit einer Polarisierbarkeit von $1,2 \times 10^{-24} \text{ cm}^3$, Lit. 40) um bis zu zwei Größenordnungen übertrifft (Lit. 37 - 39).

Mit zunehmender Feldstärke werden die Energieniveaus der Zustände Ψ_{0+} und Ψ_{0-} auseinandergeschoben, die Protonenpolarisierbarkeit nimmt ab.

In einem realen System sind die Abstände und die Orientierung der Dipole in der Umgebung einer Wasserstoffbrücke statistischen Schwankungen unterworfen. Die dadurch hervorgerufene Verteilung der Übergangsenergien macht sich im Infrarotspektrum in einer kontinuierlichen Absorption bemerkbar (Abb. 6).

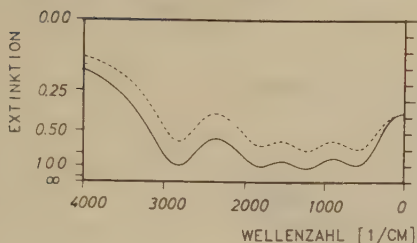


Abb. 6:

Abnahme der Intensität der kontinuierlichen Absorption des H_3O_2^+ Modellsystems bei Anhebung der Feldstärke (3.5×10^6 , 5×10^6 , 8×10^6 V/cm)

(entnommen aus Lit. 41)

Nach Sokolov (Lit. 42) ist unter gewissen Voraussetzungen eine Ankopplung der Wasserstoffbrücken - Schwingung an die Bewegung der Lösungsmittelmoleküle (oder entsprechend an Gitterschwingungen bei Festkörpern) möglich. Dabei wird jeder der ursprünglich scharfen Übergänge zwischen den Protonenniveaus breit aufgespalten.

Bedingt durch die großen Übergangsmomente der Protonenübergänge findet man oft Absorptionsbanden, die durch Kombination einer Oberschwingung mit einer Schwingung des Protonenüberganges hervorgerufen werden (Fermi - Resonanz).

Diese Erscheinungen treten besonders ausgeprägt in Systemen mit starken Wasserstoffbrücken auf.

Wasserstoffbrücken mit Doppelminimum - Potential sind aufgrund der oben

beschriebenen Wechselwirkungen gegenüber solchen mit Einfachminimum energetisch begünstigt.

Das Proton hat eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit auf beiden Seiten des Potentialwalls, die Tunnelfrequenz ist von der Höhe des Walls abhängig.

Da Infrarotübergänge mit einer Frequenz von 10^{12} bis $5 \times 10^{14} \text{ sec}^{-1}$ noch (geringfügig) schneller sind als die Tunnelfrequenz des Protons, können bei heterokonjugierten Brücken Infrarot - Absorptionsbanden der beiden Grenzzustände beobachtet werden.



$$K_{\text{PT}} = \frac{[\text{A}^- \cdots \text{H}^+ \text{B}]}{[\text{AH} \cdots \text{B}]} \quad \text{PT} = \frac{100 K_{\text{PT}}}{K_{\text{PT}} + 1}$$

Das Protontransfer - Gleichgewicht läßt sich durch Integration der entsprechenden Banden bestimmen.

Temperaturabhängige Messungen dieses Gleichgewichts erlauben außerdem eine Berechnung thermodynamischer Daten der Wasserstoffbrückenbindung (mittels der Van't Hoff Gleichung).

1.3. Biologische Membranen

Nach dem Modell von Singer und Nicolson (Lit. 2) bestehen biologische Membranen aus Lipiddoppelschichten, die teilweise mit Cholesterin durchsetzt sind und Proteinmolekülen. Man unterscheidet integrale Proteine, d.h. Proteine, die die Lipiddoppelschicht durchdringen, und periphere Proteine, die nur an einer Seite der Membran angelagert sind.

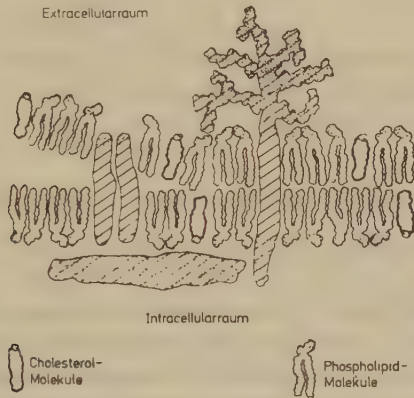


Abb. 7:

Schematische Darstellung des von Singer und Nicolson (Lit. 2) vorgeschlagenen "Flüssig - Mosaik" Modells
(entnommen aus Lit. 43)

Als hochselektive Permeabilitätsschranken grenzen die Membranen verschiedene Kompartimente voneinander ab. Durch Anlagerung von Proteinen werden die Membranen ihren spezifischen Aufgaben angepaßt.
Membranen sind als zweidimensionale Flüssigkeiten zu betrachten, da sie in einer

flüssig - kristallinen Phase vorliegen in der die Fettsäurereste der Lipide relativ freie laterale und transversale Bewegungen ausführen können.

Ein Lipidmolekül setzt sich zusammen aus einer relativ polaren Kopfgruppe, die der Außenseite der Membran zugewandt ist, und einem hydrophoben Schwanzteil im Inneren, der im wesentlichen aus einem bis zwei langkettigen Fettsäureresten besteht.

Membranlipide und Steroide lassen sich hinsichtlich ihres chemischen Aufbaus in drei Gruppen einteilen:

Phospholipide

Hier besteht die Kopfregion aus einer mit dem Glycerin - oder Sphingosinrest veresterten Phosphatgruppe. Die Phosphatgruppe ihrerseits ist meistens mit einer weiteren Moleküleinheit verestert (vgl. Kap. 1.4).

Glycolipide

Mono - oder Polysaccharide sind glycosidisch an die Kopfgruppe des Lipidmoleküls gebunden.

Cholesterin

Dieses Steroidmolekül ist zwischen die Lipidschicht eingelagert. Mit seiner polaren -OH Gruppe kann es mit dem Carbonylsauerstoffatom eines Fettsäureesters in Wechselwirkung treten. Durch die starre Struktur trägt Cholesterin zur Versteifung der Membran (im flüssig - kristallinen Zustand) bei (Lit. 43).

1.4. Phospholipide

Phospholipide kommen in allen biologischen Membranen in großer Menge vor. Sie leiten sich entweder vom Glycerin (Glycerinphosphatide) oder vom Sphingosin (Sphingosinphosphatide) ab. Den prinzipiellen Aufbau eines Glycerinphosphatids zeigt Abb. 8.

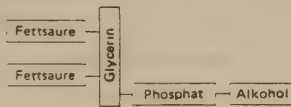


Abb. 8:
Prinzipieller Aufbau eines Glycerinphosphatids

Die Fettsäurereste bestehen im allgemeinen aus geradzahligen, unverzweigten Kohlenstoffketten mit 14 bis 24 C - Atomen. Man findet gesättigte bis mehrfach ungesättigte Fettsäurereste, wobei Doppelbindungen überwiegend in cis-Konfiguration vorliegen. Zwei Fettsäuren sind mit benachbarten -OH Gruppen des Glycerinmoleküls verestert, die dritte -OH Gruppe des Glycerins ist an einen Phosphatrest gebunden. Dadurch chiral geworden, weist das 1,2-Diacyl-3-phospho-glycerin L-Konfiguration auf.

Spezifisch in ihren Eigenschaften unterscheiden sich die Phospholipide durch eine weitere, ebenfalls an den Phosphatrest gebundene Gruppierung wie Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inosit (Abb. 9, esterbildende Gruppen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet).

In Abb. 10 ist die Konformation eines Phosphatidylcholin-Moleküls dargestellt, wie sie aus Röntgenstruktur - Untersuchungen erhalten wurde.

Im biologischen Milieu unterscheiden sich die Phospholipide durch die Ladung ihrer Kopfgruppe. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE)

liegen unter physiologischen Bedingungen als Zwitterion vor, Phosphatidylinosit (PI) und Diphosphatidylglycerin (PG) sind einfach bzw. zweifach negativ geladen. In Phosphatidylserin (PS) und auch in Phosphatidylethanolamin kann sich zwischen der negativ geladenen Phosphatgruppe und der positiv geladenen Aminogruppe des benachbarten Moleküls eine Wasserstoffbrücke ausbilden (Lit. 44 - 47).

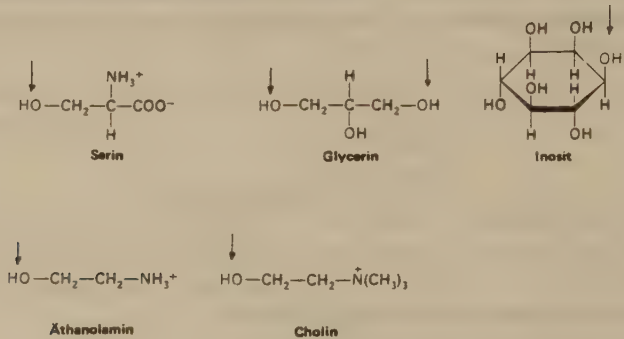


Abb. 9:

Alkoholische Komponenten in Glycerinphosphatiden

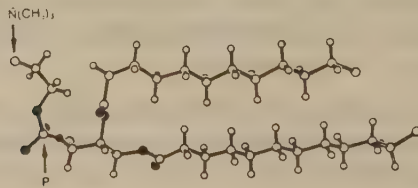


Abb. 10:

Konformation von Phosphatidylcholin

(entnommen aus Lit. 48)

2. Experimenteller Teil

2.1. Herstellung der Ausgangssubstanzen

2.1.1. O - Phospho - L - serin - P - ethylester x 2 H₂O (PSE)

In der Literatur findet man zwei Beschreibungen zur Synthese des entsprechenden Methylesters (Lit. 49,50). Erstere beschreibt eine Synthese, in der O - Phospho - L - serin mittels Diazomethan methyliert wird. Es gelang den Autoren jedoch nur ein Gemisch (55:45) aus dem gewünschten Produkt und der gleichzeitig N - methylierten Substanz zu erhalten (¹H - NMR Daten). Sie konnten aber die beiden Endprodukte nicht trennen.

In der zweiten Literatur wird ein Syntheseweg über mehrere Stufen beschrieben. Ausgangssubstanz war ein mit Schutzgruppen am Carboxyl- und Aminoterminus versehenes O - Phospho - L - serin. Nach einer Reaktion mit Methyljodid werden die Schutzgruppen durch Hydrieren (H₂/Pt) abgespalten. Wegen der geringen Ausbeute war auch diese Synthese für die vorliegende Arbeit (es wurden mehrere Gramm Endprodukt benötigt) nicht praktikabel.

Bei der nachstehend beschriebenen Synthese ist auf strengen Ausschluß von Wasser zu achten. Ethanol sowie die zum Ausschütteln benötigten Lösungsmittel wurden deshalb mit frisch ausgeheiztem Molekularsieb 3 Å getrocknet. Die zusammengebaute Apparatur, ebenso wie der später gebrauchte Rotationsverdampfer, wurden sorgfältig ausgeheizt (Vakuum 10⁻² Torr, Falle mit flüssigem Stickstoff).

Synthese:

2 g (11,2 mmol) O - Phospho - L - serin werden in 40 ml Ethanol suspendiert und am Rückfluß erhitzt. Im Lauf einer Stunde tropft man 1,34 g (12,2 mmol) frisch destilliertes Thionylchlorid dazu. Das suspendierte O - Phosphoserin geht - bedingt durch die eintretende Reaktion - in Lösung und man erhält eine

wasserklare bis leicht gelbliche Flüssigkeit. Nach Zutropfen des Thionylchlorid erhitzt man eine weitere halbe Stunde am Rückfluß und läßt die Lösung langsam abkühlen.

Sofort nach dem Abkühlen zieht man mithilfe eines Rotationsverdampfers das Lösungsmittel ab, übrig bleibt eine klare hochviskose Masse. Nach zweimaligem Ausschütteln mit 50 ml Ether wird noch zweimal mit 50 ml Ether/Aceton (1:1) nachgewaschen. Die zurückbleibende Substanz wird in 50 ml trockenem Ethanol aufgenommen und einige Stunden stehen gelassen. Man erhält einen weißen feinkristallinen Niederschlag, dieser wird abgenutscht und ca. eine Stunde im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

Anhand von IR - spektroskopischen Daten konnte ermittelt werden, daß es sich bei der erhaltenen Substanz um ein Gemisch aus dem gewünschten O - Phosphoserin - P - ethylester und um dessen Hydrochlorid handelt.

Zwitterion: IR - Bande bei 1505 cm^{-1}

Hydrochlorid: IR - Bande bei 1558 cm^{-1}

Potentiometrische Titration:

pK_a Phosphat 1,4

pK_a Aminogruppe 9,7

Das Hydrochlorid wurde durch Zugabe von Tetrabutylammonium - hydroxid in wässriger Lösung in das Endprodukt übergeführt (Verschwinden der Bande bei 1558 cm^{-1}). Da das entstehende Tetrabutylammonium - chlorid in Ethanol löslich war, das gewünschte Endprodukt jedoch nicht, gelang es, das Endprodukt rein zu erhalten.

Schmelzpunkt: 162 - 163 Grad Celsius

Ausbeute: 60% d. Theorie

Analyse:

	%C	%H	%N
gefunden:	24,19	6,45	5,57
theoretisch:	24,30	6,47	5,62

Aus den Analysedaten war zu entnehmen, daß das Endprodukt mit zwei Molekülen Wasser kristallisierte. ^1H - und ^{31}P -NMR Daten sind in Lit. 51 beschrieben.

2.1.2. Poly-L-Histidin $(\text{His})_n$

Es wurde Poly-L-Histidin (Sigma-Chemie, München) mit einem Polymerisationsgrad von 200 verwendet ($\text{pK}_a = 6.15$, Lit. 52). Üblicherweise löst man diese Polyamino-säure in verdünnter Essigsäure. Erste Versuche zeigten jedoch, daß besonders in Filmen mit Kationen die Essigsäure bei der Zentrifugation nicht vollständig entfernt werden konnte. Man versuchte deshalb, durch Mischung mit gelöstem PSE, das ja in Wasser sauer reagiert, das Poly-L-Histidin in Lösung zu bringen. Bei Zugabe von reinem PSE gelang dies noch relativ gut, wogegen bei Filmen mit Kationen, die durch Zugabe des entsprechenden Hydroxids dem System zugeführt wurden, das Histidin wegen des veränderten pH nur schwer in Lösung zu bringen war. Dies machte sich auch in der Qualität der Filme bemerkbar, die zu starker IR Streuung neigten.

2.1.3. Poly-L-Lysin $(\text{Lys})_n$

Das als Hydrobromid erhältliche Poly-L-Lysin wurde von der Fa. Sigma-Chemie, München bezogen und hatte einen Polymerisationsgrad von 2300. Vorversuche mit derselben Substanz aber einem Polymerisationsgrad von 1600 (und kleiner) zeigten, daß damit nur Filme hergestellt werden konnten, die nach dem Trocknen keine einheitliche Sekundärstruktur der Polyamino-säure aufwiesen. Abhängig von der Präparation wurde α -Struktur mit wechselnden Anteilen β -Faltblattstruktur erhalten. Erst bei einem Polymerisationsgrad von 2300 erhielt man getrocknete Poly-L-Lysin Filme mit reiner α -Helix Struktur. Dies war notwendig, um auch eventuelle Konformationsänderungen bei den untersuchten Systemen feststellen zu können.

Das Hydrobromid wurde mithilfe eines Ionenaustauschers (Merck Lewatit MP 5080, Korngröße 0.1 - 0.25 mm) in die freie Base übergeführt.

Für etwa 200 mg Ausgangssubstanz verwendete man eine Säule von 1 cm Durchmesser, ca. 15 cm hoch gefüllt mit dem Austauschermaterial. Das Eluat wurde bei einem pH > 9,5 abgenommen, durch potentiometrische Titration bestimmte man den Gehalt an freier Base.

Durch Verdünnen stellte man eine 0.03 molare Lösung her.

Wegen der hohen CO₂ Empfindlichkeit des Poly-L-Lysin (pKa = 10,44 Lit. 53) mußten sämtliche Lösungen in einer Glove-Box gehandhabt werden, die mit KOH-Plättchen CO₂-frei gehalten wurde.

2.1.4. Salzlösungen

Gesättigte Salzlösungen wurden zur Einstellung einer definierten Luftfeuchtigkeit über dem Film benutzt. Man benutzte 10 ml Glaskölbchen mit NS 14,5 Schliff, bei denen der Glasbläser den Boden abgeplattet hatte. Sie wurden mit der gesättigten Salzlösung gefüllt, im Kölbchen mußte stets ein Rest Bodensatz vorhanden sein.

Außerdem wurde ein kleiner Rührfisch in das Gefäß gegeben (vergl. dazu Kap. 2.3.2).

Tabelle 1:

Relative Luftfeuchtigkeit (in %) über verschiedenen Salzlösungen bei 25 °C

Salz	rel. LF (Lit. 54)
LiCl	11,1
CaCl ₂	28,8
K ₂ CO ₃	42,8
MgNO ₃	52,8
NaBr	57,7
NaNO ₂	66,0
SrCl ₂	70,8
NaCl	75,3
KCl	84,3
BaCl ₂	90,2

2.1.5. Weitere Substanzen

0,1 N NaOH, $f = 1,00$ (20 °C) (Merck, Darmstadt)

0,1 N KOH, $f = 1,00$ (20 °C) (Merck, Darmstadt)

0,1 N LiOH:

4,196 g LiOH x H₂O p.a. (Fluka, Neuulm) wurden mit bidest. H₂O auf 1 Liter aufgefüllt.

Ca(OH)₂ – Lösung:

0,1011 g Ca(OH)₂ (Marmorkalkhydrat von Fluka, Neuulm) wurden mit bidest. H₂O auf 0,5 Liter aufgefüllt. Man erhielt nach zwei Tagen Rühren eine 0,0055 N Lösung.

Alle Basen wurden wegen ihrer CO₂ Empfindlichkeit ebenfalls in der Glove – box gehandhabt (vergl. Kap. 2.1.3).

2.2. Präparation der Proben

Alle Systeme wurden in Form von Filmen untersucht, die man aus wäßriger Lösung in einem Zentrifugations - Trocknungs - Verfahren gewinnen konnte.

Die Substanzen wurden einzeln (Ausnahme: Poly - L - Histidin) in Form wäßriger Lösungen (stöchiometrisch) auf einen Probenträger gegeben und durch kurzes Rühren vermischt. Der Probenträger wird in einen Zentrifugenbecher gesetzt, das Wasser während der Zentrifugation im Vakuum entfernt.

2.2.1. Probenträger

Der Probenträger besteht aus einer runden polykristallinen Siliciumscheibe von ca. 2 mm Dicke, die auf der Unterseite plan geschliffen und auf der Oberseite mit einer zylindrischen Vertiefung versehen wurde. Beide Seiten wurden mit Diamantschleifpaste (Fa. E. Winter und Sohn, Hamburg; abnehmende Körnung bis $1\ \mu$) hochglanzpoliert.

Auf die zylindrische Vertiefung wurde ein rechteckiger ca. 5 mm hoher Edelstahlrahmen geklebt (Epoxid - Kleber Uniset A401 - 12 der Fa. Amicon Corp., Lexington, Mass., USA), der zur Aufnahme der Probelösungen dient. An den Längsseiten des Rahmens sind zwei Führungsbleche angebracht, die den Probenträger im Zentrifugenbecher zentriert halten (siehe Abb. 12).

Der Probenträger wird in den Zentrifugenbecher (Abb. 11) eingesetzt, geführt und zentriert durch zwei Einkerbungen im Becherrand. Er schwimmt dort auf einem Quecksilbertropfen, sodaß er sich im Schwerfeld des Ausschwingrotors senkrecht zum Kraftvektor einstellen kann (Der Probenträger hat in den Führungen ein kleines Spiel). Die in den Probenträger eingeschliffene zylindrische Vertiefung ist so angebracht, daß die Zylinderachse während der Zentrifugation mit der Zentrifugenachse zusammenfällt.

Durch ein Loch (ca. 0,1 mm Durchmesser) im Deckel des Zentrifugenbeckers verdampft in der - während der Zentrifugation evakuierten - Zentrifuge das Lösungsmittel. Zurück bleibt ein trockener Film auf dem Probenträger.

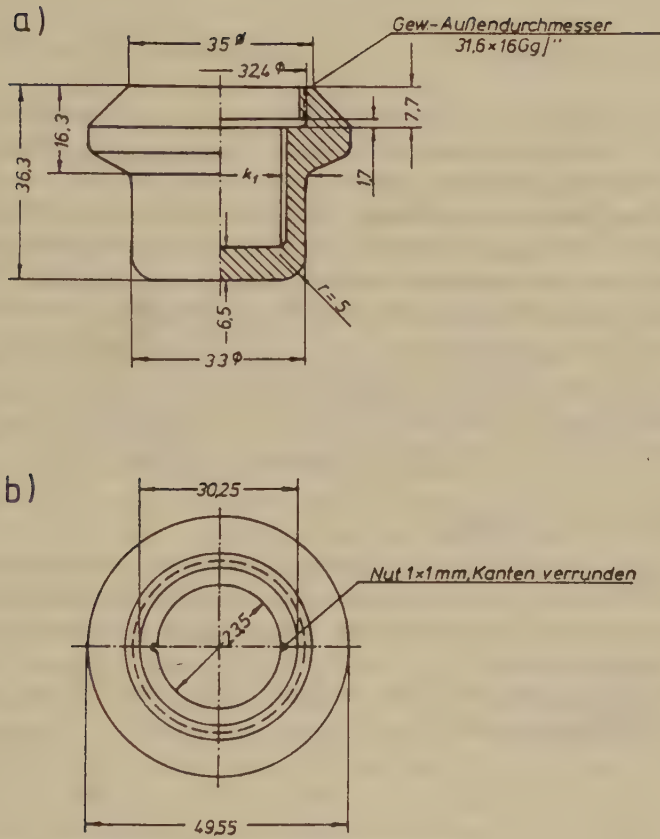


Abb. 11:
Zentrifugenbecher ohne Deckel
a) Seitenansicht
b) Aufsicht
(entnommen aus Lit. 55)

2.2.2. Zentrifugation

Alle Filme wurden bei 20 °C bei 13600 g in einer Ultrazentrifuge (Beckman L5 - 50, Schwenkbecherrotor SW27, 10000 U/min) solange zentrifugiert, bis ein Endvakuum von 10^{-3} Torr erreicht war.

Die Zentrifugationszeit ist abhängig von der Art und Menge des Lösungsmittels sowie von der eingestellten Temperatur in der Zentrifuge. Für 1,5 ml wäßriger Lösung, was dem maximalen Fassungsvermögen eines Probenträgers entspricht, benötigt man (bei 20 °C) ca. 200 Minuten Zentrifugationszeit.

Um die Haftung der Filme auf dem neu hergestellten Probenträger zu verbessern, ätzte man die zylindrische Vertiefung (aus Silicium) leicht an. Dazu gab man zweimal 15 Minuten 1 N KOH in den Probenträger. Zwischen und nach den Behandlungen mit KOH wurde ausgiebig mit dest. Wasser gespült.

Vorteile dieses Verfahrens:

Man erhält einen Film mit konstanter, definierter Schichtdicke und glatter Oberfläche. Bei der infrarotspektroskopischen Untersuchung ist die Substanzmenge im Probenstrahl gut reproduzierbar, gleichzeitig wird Lichtstreuung am Film weitgehend vermieden.

Trotz der geringen Schichtdicke der Filme waren in den IR - Spektren keine Interferenzen zu beobachten.

2.3. Aufnahme der Infrarotspektren

2.3.1. Küvette

Boden und Deckel der Küvette (Abb. 12,13) wurden aus Edelstahlblindflanschteilen NW50KF der Fa. Leybold - Heraeus, Köln, gefertigt. Beide Teile wurden mit einer Bohrung versehen (Deckel 32 mm, Boden 27 bzw. 35 mm) und auf die äußere Seite wurde über die Bohrungen je ein Infrarotfenster von 2 mm Dicke aus hochglanzpoliertem, polykristallinen Silizium (oben: 35 mm, unten: 30 mm Durchmesser) geklebt (Uhu Endfest 300). Zur Vergrößerung des Probenraumes ist zwischen Fenster und Küvettendeckel zusätzlich ein Distanzring aus Aluminium eingeklebt. In die 35 mm Bohrung des Küvettenbodens ist ein Tefloneinsatz eingepreßt, der zur Aufnahme des Probenträgers dient. Ein Zentrierring mit Dichtring verbindet beide Küvettenteile, eine Flanschklammer hält sie zusammen. Damit der Probenraum evakuiert werden kann, durchbohrt man den Deckel schräg (Winkel 10°, Durchmesser 8,0 mm) und setzt einen Edelstahlstutzen (Innendurchmesser 6,0 mm, Länge 20 mm) paßgenau ein. Auf diesen Stutzen wird ein Glasaufsatz (Abb. 13) geklebt.

Der Glasaufsatz dient zum Evakuieren des Probenraumes und zum Einstellen einer definierten Luftfeuchtigkeit. An einem Schliff (NS 14,5) werden die Kölbchen mit der gesättigten Salzlösung angebracht, durch Evakuieren des Probenraumes (bis zum Dampfdruck der gesättigten Salzlösung) wird die Gleichgewichtseinstellung beschleunigt. Zwei Young - Hähne (PTT - 8 und PTT - 6) erlauben ein Auswechseln der Kölbchen, ohne daß der Probenraum belüftet werden muß.

Eine Halterung aus Polyethylen, die am Küvettenboden angeschraubt ist, fixiert die Küvette im Strahlengang des Spektrographen. Die Glasbauteile für die Proben- und die Vergleichsküvette sind spiegelbildlich konstruiert.

Um die Küvetten während der Messung thermostatisieren zu können, wurden an den Flanschklammern Kühlmanschetten angebracht. Über PVC - Schläuche und Schlauchkupplungen (Fa. C.K. Walther, Wuppertal) werden die Küvetten mit einem Umwälzthermostaten (Typ KT 33, Fa. Haake Meßtechnik, Karlsruhe) verbunden.

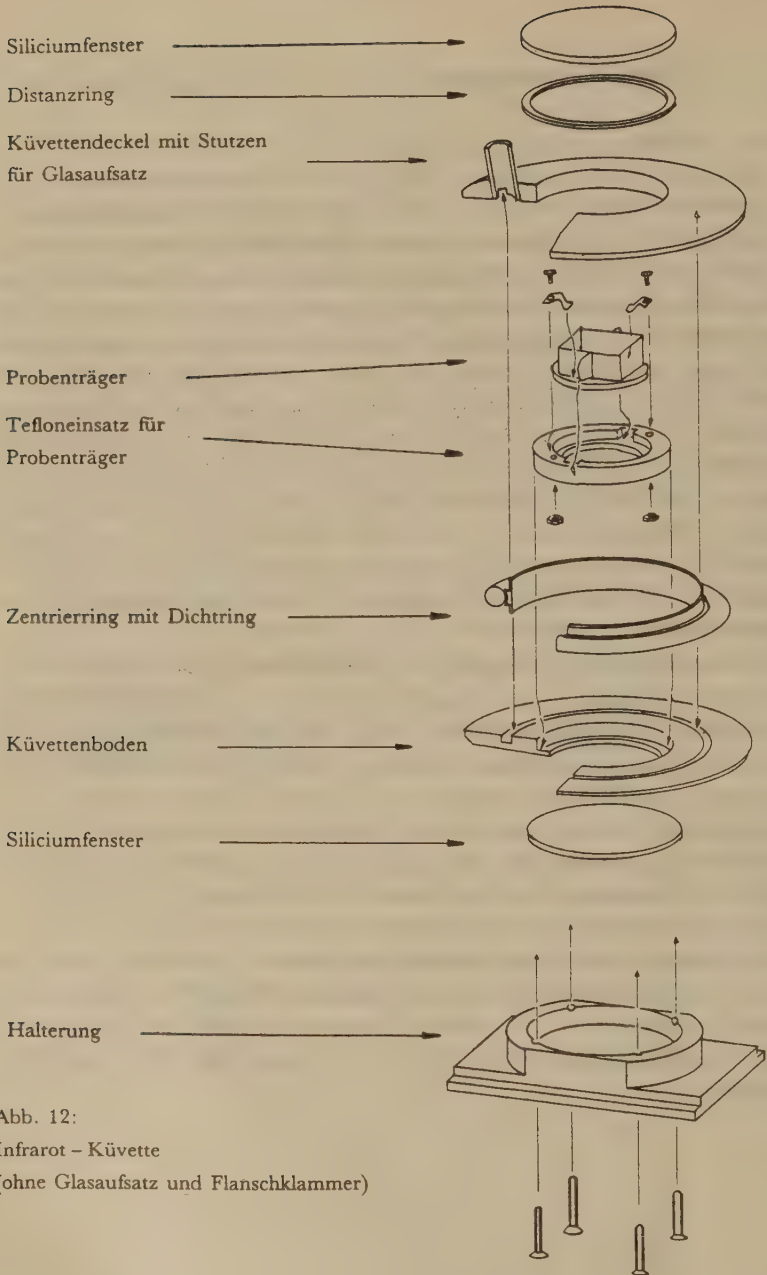


Abb. 12:
Infrarot - Küvette
(ohne Glasaufsatz und Flanschklammer)

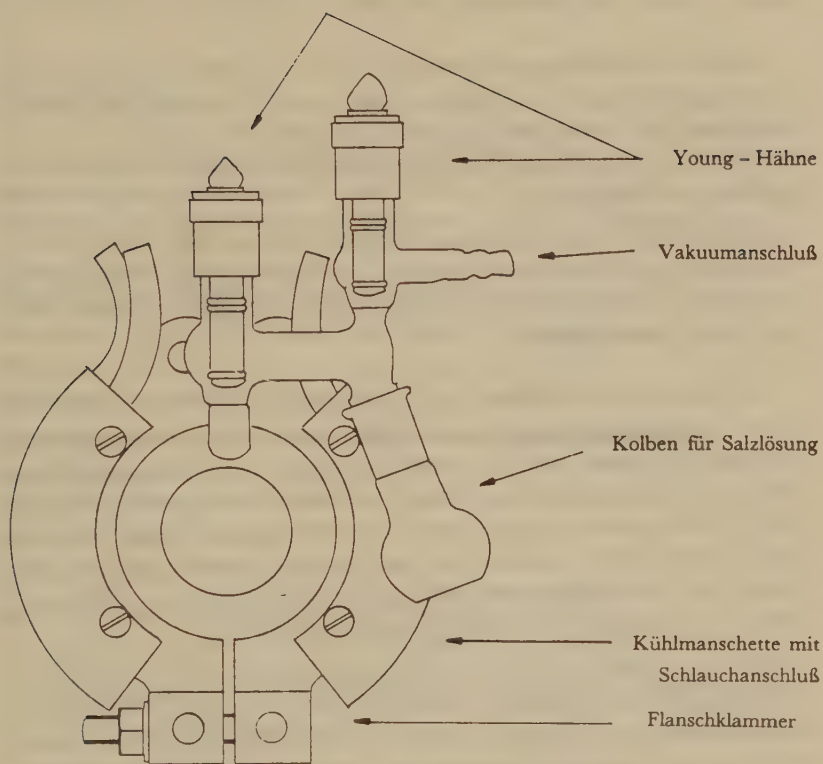


Abb. 13:
Infrarot - Küvette mit Glasaufsatz

2.3.2. Trocknen und Hydratisieren der Filme

Während der Zentrifugation werden die Filme nicht vollständig trocken. Um aber vollständige Trocknung zu erreichen, gibt man den Probenträger (mit Film) in die vakuumdichte Meßküvette und evakuiert diese 48 Stunden bei 10^{-2} Torr. Eine zwischen Vakuumpumpe und Küvette geschaltete Zeolithfalle verbessert die Trocknung noch erheblich.

Manche Filme hielten dieses scharfe Trocknen nicht aus, sie wurden brüchig und blätterten vom Probenträger ab. Man verzichtete in solchen Fällen auf die Nachtrocknung und hydratisierte die aus der Zentrifuge genommenen Proben gleich bei 11% rel. Luftfeuchtigkeit.

Zum Hydratisieren der Filme wird am Glasaufsatz der Küvette das Kölbchen mit der gesättigten Salzlösung angebracht (Kap. 2.1.4). Der innere Küvettenhahn bleibt dabei geschlossen, um den Zutritt von Raumluft, besonders von CO_2 zu verhindern. Durch Anlegen von Vakuum im äußeren Bereich des Glasaufsatzes bringt man die Salzlösung im Kölbchen kurz zum Sieden und schließt danach den äußeren Küvettenhahn. Siedeverzüge und damit ein Spritzen der Salzlösung während des Evakuierens wurden wirkungsvoll dadurch vermieden, daß man die siedende Salzlösung mit einem kleinen Magnetrührfisch rührte.

Nach dem Öffnen des inneren Küvettenhahnes stellt sich über dem Film der Wasserdampfdruck der gesättigten Salzlösung ein. Da durch das kurze Evakuieren auch alle Fremdgase (Raumluft) aus dem Glasaufsatz der Küvette entfernt waren, ergab sich eine sehr schnelle Einstellung des Dampfdruckgleichgewichts über dem Film.

Zur Einstellung dieses Gleichgewichts wurden alle Filme ca. 22 Stunden bei 23 ± 0.4 °C thermostatisiert. Anschließend wurde der innere Küvettenhahn geschlossen und eine Messung durchgeführt. Danach wurde das Kölbchen mit der Salzlösung gewechselt (nächsthöherer Wasserdampfpartialdruck) und wieder 22 Stunden thermostatisiert usw...

Da die Siliciumscheiben der Probenträger von den stark basischen Lysin - Filmen angegriffen werden, mußte die Zeit für die Gleichgewichtseinstellung

dieser Filme auf 11 Stunden reduziert werden.

2.3.3. Spektrograph

Die infrarotspektroskopischen Messungen wurden an einem Zweistrahlgitterspektrophotometer (der Fa. Bodenseewerk Perkin - Elmer, Typ 325) durchgeführt. Alle Spektren wurden im Wellenzahlbereich $4000 - 450 \text{ cm}^{-1}$ aufgezeichnet.

Spaltprogramm: 8

(bedingt durch die hohen Reflexionsverluste an den Siliziumscheiben)

Verstärkung: 3.5 bis 7.0 (ca. 10 % Überspringen des Schreibers)

Dämpfung: 2 - 3

Registriereschwindigkeit: 0.5 bis 1

Die Spektren wurden in digitalisierter Form auf Magnetband aufgezeichnet.

Digitale Auflösung:

1.66 cm^{-1} ($4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$)

0.833 cm^{-1} ($2000 - 1000 \text{ cm}^{-1}$)

0.333 cm^{-1} (unter 1000 cm^{-1})

Die Auflösung der Transmission (0 - 100 %) beträgt ca. 850 Digits.

Zur Darstellung wurden die Spektren leicht geglättet (Smooth 0.01).

Die Ablesegenauigkeit der Wellenzahlangaben (bei der Auswertung) beträgt:

$\pm 3 \text{ cm}^{-1}$ von $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$

$\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ unter 2000 cm^{-1}

Da im Bereich $630 - 580 \text{ cm}^{-1}$ eine nicht kompensierbare Siliciumschwingung auftritt, wird dieser Abschnitt in den Abbildungen nur durch eine punktierte Linie gekennzeichnet.

Inkompensationen durch CO_2 und Wasserdampf im Strahlengang ließen sich durch Trockenluftspülung des Geräteinneren vermeiden.

Alle Spektren wurden bei $23 \pm 0,1^\circ\text{C}$ aufgenommen. Während der Messung wurde der innere Küvettenhahn geschlossen, um eine Veränderung des Wasserdampfpartialdrucks über dem Film zu verhindern.

2.4. Untersuchte Systeme

Die Meßreihen lassen sich in drei Gruppen einteilen:

1. PSE mit verschiedenen Kationen

PSE

PSE deuteriert

PSE + LiOH

PSE + NaOH

PSE + KOH

PSE + 0,5 Ca(OH)₂

2. (His)_n mit PSE und verschiedenen Kationen

(His)_n + PSE

(His)_n + PSE + LiOH

(His)_n + PSE + NaOH

(His)_n + PSE + KOH

(His)_n + PSE + 0,5 Ca(OH)₂

3. (Lys)_n mit PSE und verschiedenen Kationen

(Lys)_n + PSE

(Lys)_n + PSE + LiOH

(Lys)_n + PSE + NaOH

(Lys)_n + PSE + KOH

(Lys)_n + PSE + 0.5 Ca(OH)₂

Jeder Film wurde durch Zusammengeben von 6 µmol der einzelnen Komponenten hergestellt. PSE und die Polyaminosäuren wurden als 0.03 molare Lösungen (200 µl pro Film) eingesetzt ((His)_n siehe Kap. 2.1.2), die Basen als 0,1 N Lösung (60µl pro Film). Ca(OH)₂ konnte wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit nur 0,0055 N (1100 µl pro Film) verwendet werden.

2.5. Aufgabenstellung

Anhand eines Modellsystems, das der Kopfgruppe eines Phospholipids entspricht (PSE), kann die Wechselwirkung der Phospholipid - Kopfgruppe mit benachbarten Kopfgruppen längs der Membranoberfläche untersucht werden.

Im Anschluß daran ist die Phospholipid - Protein Wechselwirkung zu untersuchen. Homo - Polypeptide von Histidin bzw. Lysin werden dabei als Modellschubstanzen benutzt. Sie erlauben eine spezifische Untersuchung der Wechselwirkung einzelner Proteinseitengruppen mit dem PSE - Modellmolekül.

Die aufgenommenen Spektren wurden nach folgenden Kriterien ausgewertet:

Ausbildung von Wasserstoffbrücken

Lage der Protontransfer - Gleichgewichte

Einfluß der Kationen

Einfluß der Hydratisierung

3. Ergebnisse und Diskussion

Phosphatidylserin (PS), wie in Abb. 14 dargestellt, spielt eine wichtige Rolle bei der Wechselwirkung der Membran mit positiv geladenen Ionen (Lit. 56) und Proteinen (Lit. 57).

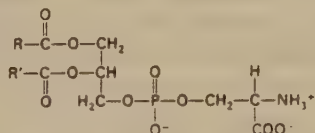


Abb. 14:

Strukturformel eines Phosphatidylserinmoleküls

Das Verhalten von PS in wäßriger Lösung unterscheidet sich von dem zwitterionischer Lipide deutlich. Bei hohem Wassergehalt und in der Abwesenheit von Salzen sind große Mengen Wasser zwischen benachbarten Doppelschichten eingelagert, verursacht durch die elektrostatische Abstoßung der geladenen Kopfgruppen (Lit. 58). Dies führt zur Ausbildung von Vesikeln.

Bei Anwesenheit von monovalenten Kationen wird die negative Ladung der Membranoberfläche abgeschirmt, die Wassermenge zwischen den Doppelschichten ist dann reduziert. Die Vesikelbildung nimmt ab und man beobachtet multilamellare Strukturen (Lit. 58).

Auch die Geschwindigkeit der lateralen Diffusion der Phospholipide entlang der Membranoberfläche wird geringer (Lit. 59).

Ein noch stärkerer Effekt ist bei zweiwertigen Kationen zu beobachten. Während durch Mg^{2+} nur eine intermolekulare Wechselwirkung zwischen benachbarten Phospholipiden derselben Membran hervorgerufen wird, werden

durch Ca^{2+} die Doppelschichten miteinander verbrückt. Dies führt zu einer völligen Verdrängung des Wassers aus den Membranzwischenräumen und damit zur Membranaggregation.

Saure Phospholipide sind in der Membran über intermolekulare Wasserstoffbrücken miteinander verbunden (Lit.60). Im PS existiert wie auch im PE eine derartige Brücke zwischen der negativ geladenen Phosphat- und der positiv geladenen Aminogruppe (Lit. 44 - 47).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß sich im PS gleichzeitig eine zweite Wasserstoffbrücke ausbildet.

Abb. 15 zeigt eine mögliche Konformation der PS-Kopfgruppe und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken anhand des PSE-Modellsystems.

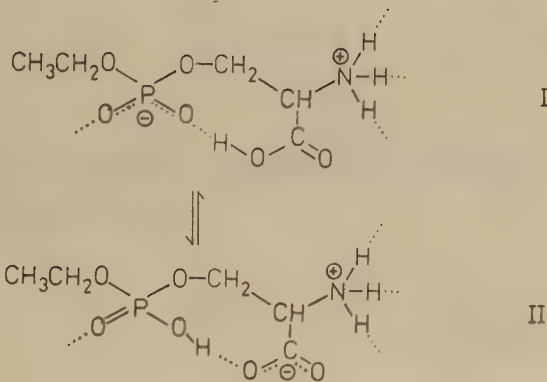


Abb. 15:
Konformation von PSE

Erste Untersuchungen von Papakostidis (Lit.15) bestärken diese Annahme. Es wurde O - Phosphoserin - P - methylester, ein Molekül, das sich von PSE nur in der Estergruppe unterscheidet, in wäßriger Lösung und verschiedenen Protonierungsgraden untersucht. Papakostidis kommt anhand IR - spektroskopischer Daten zu dem Ergebnis, daß diese Substanz in wäßriger Lösung eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der Carbonsäure - und der Phosphatgruppierung ausbilden kann. Die Stabilität dieser Brücke hängt entscheidend vom pH - Wert der Lösung ab.

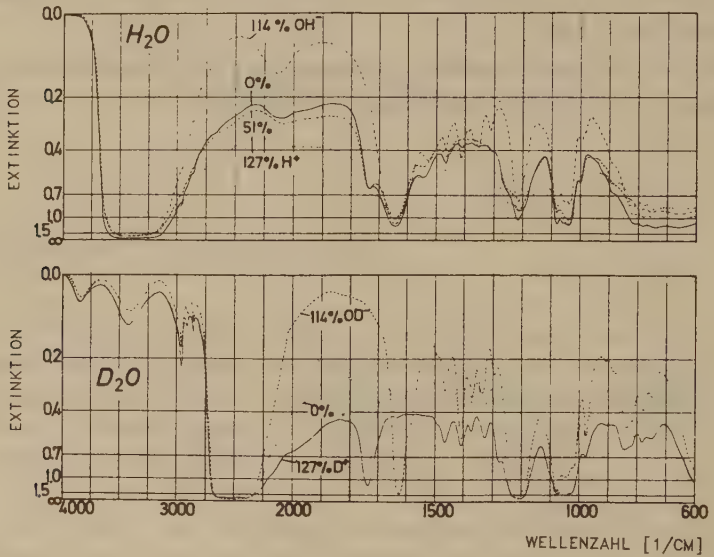


Abb. 16

IR - Spektren von O - Phospho - L - serin - P - methylester
bei verschiedenem Protonierungsgrad

a) H_2O - Lösung

b) D_2O - Lösung

(entnommen aus Lit. 15)

Wie in Abb. 16 dargestellt, findet man im IR - Spektrum des Zwitterions eine deutlich ausgeprägte kontinuierliche Absorption über den gesamten Meßbereich. Bei Zugabe von Base wird dem Zwitterion das Proton entrissen, infolgedessen verschwindet die kontinuierliche Absorption. Erhöht man dagegen den Grad der Protonierung, bilden sich neben dem Zwitterion leicht polarisierbare $H_5O_2^+$ - Brücken aus, die Intensität der kontinuierlichen Absorption nimmt deshalb, insbesondere im Bereich kleinerer Wellenzahlen, noch etwas zu.

Aus der Titrationskurve von Papakostidis (Lit. 15) in Abb. 17 ist zu entnehmen, daß im pH - Bereich 1.3 bis 3 das Zwitterion deprotoniert wird, die Deprotonierung der Aminogruppe erfolgt von pH 8 - 10.

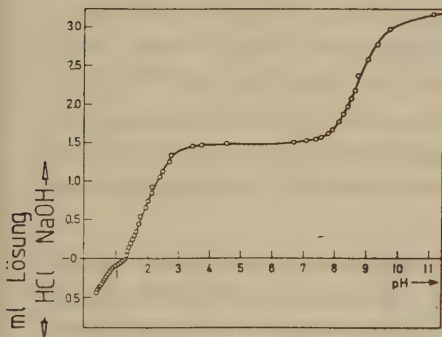


Abb. 17

Titrationkurve einer 1 N wäßrigen Lösung
von O - Phospho - L - serin - P - methylester
(entnommen aus Lit. 15)

Auch in biologischen Systemen gibt es Anzeichen für die Ausbildung vergleichbarer Strukturen:

Browning und Seelig (Lit. 16) stellten anhand von ^2H - und ^{31}P -NMR Untersuchungen fest, daß die $-\text{CH}_2-$ Gruppen der PS und PE Phospholipidköpfe relativ starr sind im Vergleich zu PC.

Auch der Kationeneinfluß zeigte bei den biologischen Systemen interessante Ergebnisse:

Während isoelektrische Phospholipide nur wenig quellen, nehmen geladene Lipide große Mengen Wasser auf. Im System Wasser/Rinderhirn - PS beispielsweise (Lit. 61) konnte ^2H -NMR spektroskopisch gezeigt werden, daß bei Anwesenheit von Na^+ bis zu 20 Wassermoleküle pro Kopfgruppe gebunden werden, weitere Wassermoleküle weisen die Bewegungscharakteristik freier Wassermoleküle auf.

Die Wechselwirkung einfach geladener Kationen mit biologischen Membranen ist vergleichsweise gering (Lit. 62). Dagegen stellte man fest (Lit. 63 - 67), daß speziell PS bei Anwesenheit von Ca^{2+} Membranfusions- und Aggregationsreaktionen zeigte.

Ca^{2+} (Lit. 63) verdrängt dabei einwertige Kationen und Wasser aus den Zwischenräumen der lamellaren Schichten und bildet durch Wechselwirkung mit zwei benachbarten Lipidschichten (Lit. 65) Chelatkomplexe. Der Komplex enthält weniger als drei Wassermoleküle pro Lipidrest (Lit. 63, 65).

In jüngster Zeit wurde der Kationeneinfluß auf Phosphatidylserin mithilfe der IR - Spektroskopie eingehender untersucht (Lit. 68). Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß sich abhängig von der Art des Kations verschiedene Konformationen der Lipid - Kopfgruppen ausbilden können.

3.1.1. PSE

In den Abb. 18–22 und 24 sind die Spektren des PSE–Zwitterions in drei Teilbereichen, ausgehend von relativ getrockneten Filmen (11 %LF) bis zu stark hydratisierten Filmen (91 %LF) dargestellt. Es wurde versucht, möglichst alle Banden zuzuordnen. Insbesondere die Veränderungen der Bandenlagen während des Hydratisierens waren von Interesse.

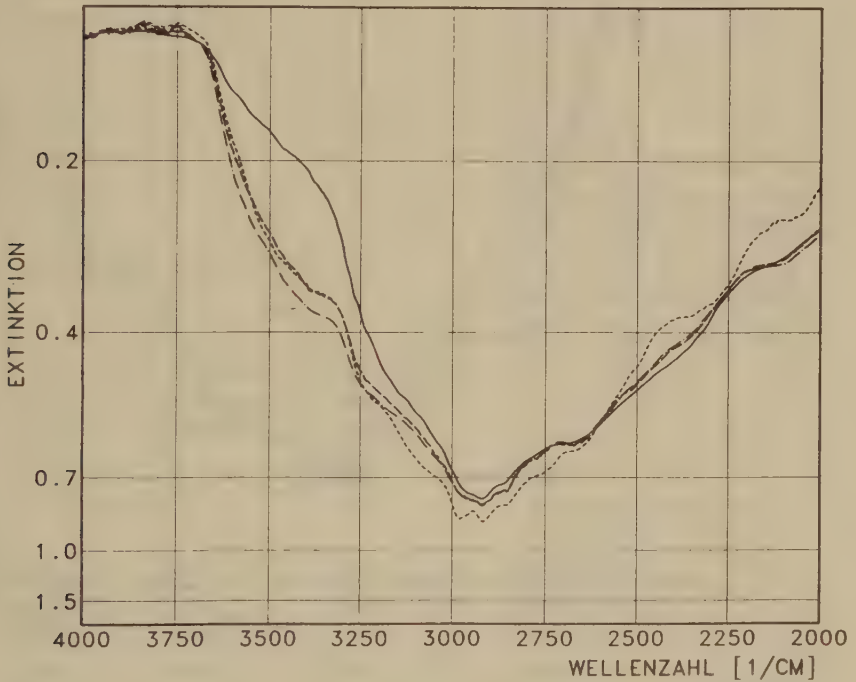


Abb. 18:

PSE

— 11% LF, --- 29% LF, -.- 44% LF
..... 57% LF

In Abb. 18 ist bei 3400 cm^{-1} eine Zunahme der Wasserbande von 11 - 44 %LF festzustellen, von 57 - 66 %LF nimmt die Intensität wieder leicht ab. Dafür beobachtet man beim Übergang von 44 nach 57 %LF das Auftreten einer relativ intensiven Absorption im Bereich $3200 - 3100\text{ cm}^{-1}$. Die Bande wird hervorgerufen durch sehr kräftig gebundenes zwischen NH_3^+ - und PO_2^- - Gruppen eingelagertes Wasser (Strukturwasser) und verschwindet beim Übergang nach 91 %LF wieder.

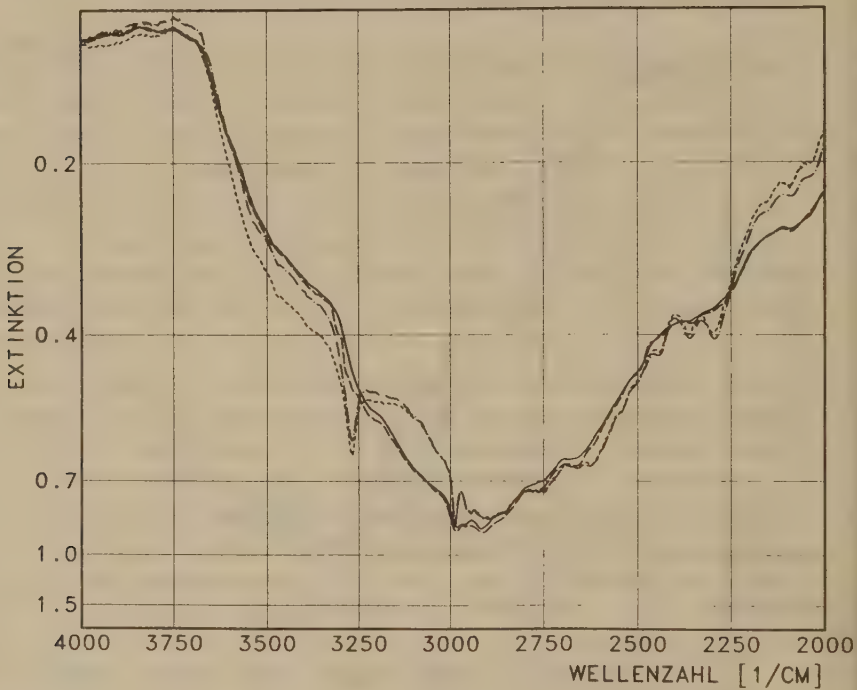


Abb. 19:

PSE

— 66% LF, --- 75% LF, - - - 85% LF,
- . - 91% LF

Der Wassergehalt des Films nimmt von 29 - 91 %LF wesentlich weniger stark zu als bei den Filmen, die Kationen enthalten, d.h. obwohl die Luftfeuchtigkeit über dem Film stark erhöht wird und aufgrund der Veränderung anderer Banden auf Strukturänderungen geschlossen werden kann, nimmt der Film nur wenig weiteres Wasser auf.

Tabelle 2.1:

Zuordnung der PSE - Schwingungen

Wellenzahl (cm^{-1})			Schwingung	Lit.
11	57	85	% LF	
3400	3400	3400	$\nu(\text{H}_2\text{O})$	
—	—	3270	$\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$	
			in symmetrischer Umgebung	
			mit H_2O über relativ schwache	
			Wasserstoffbrücken verknüpft.	
—	3200 - 3100	—	$\nu(\text{OH})$, über starke	
			Wasserstoffbrücken gebundene	
			Wassermoleküle (Strukturwasser)	
3250 - 2700	3250 - 2700	3250 - 2900	breite $\nu(\text{NH}_3^+)$ -	(69)
	Intensitäts -	Intensitäts -	Absorption	
	zunahme	zunahme		
—	—	2991	$\nu(\text{C} - \text{H})$	
			Konformationsänderung	
			des Systems	
2951	2951	2951	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	
2920	2920	2920	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$	
2870	2870	2870	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$	
2856	2856	2856	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$	
2664	2664	2760 sh	Kombinationsschwingungen	
	schwächer	2664	verbrückter Systeme	
2300 sh	2300 (sh)	2400		
	stärker	2368		
		2302		
2100	2100	2095		
		2045		

Ab 85 %LF (Abb. 19) sind eine Zunahme der Absorption bei 3400 cm^{-1} und eine Abnahme der bei 3100 cm^{-1} zu erkennen. Gleichzeitig mit der Abnahme der Bande bei 3100 cm^{-1} treten zwei scharfe Absorptionen bei 3270 und 2991 cm^{-1} auf. Weiterhin machen sich Absorptionen bei 2368 und 2302 cm^{-1} sowie 2095 und 2042 cm^{-1} bemerkbar.

Diese Veränderungen zeigen eine Strukturumwandlung in den Proben an, die etwa bei 85 %LF beginnt. Wie im folgenden näher diskutiert, brechen ab 85 %LF die intermolekularen Wasserstoffbrücken zwischen Amino- und Phosphatgruppe auf (siehe Abb. 15). Makroskopisch macht sich dies dadurch bemerkbar, daß bei Luftfeuchtigkeiten größer als 91 % der PSE-Film schlagartig starke Wasseraufnahme zeigte und vom (während der Messung senkrecht stehenden) Probenträger herunterfloß.

Eine Absorption bei 3270 cm^{-1} tritt nur bei großem Hydratationsgrad (85 %LF) des Filmes auf. Diese kann nur durch $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ verursacht sein, wobei diese Gruppen in sehr symmetrischer Umgebung vorliegen, denn die Entartung dieser Schwingung ist nicht aufgehoben. Die extrem hohe Lage dieser Bande zeigt, daß die Brücken zwischen NH_3^+ Gruppen und Wassermolekülen erstaunlich schwach sind. Letzteres wird durch Veränderungen an der $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$ Schwingung im folgenden bestätigt.

Bei höheren Luftfeuchtigkeiten findet man außerdem eine Bande bei 2991 cm^{-1} . Diese Absorption wird einer $\nu(\text{C}-\text{H})$ Schwingung zugeordnet, vermutlich handelt es sich um das tertiäre C-H der Seringruppe. Daß die Bande erst bei höheren Luftfeuchtigkeiten auftritt, hängt mit einer Konformationsänderung, einer Auflockerung der Struktur durch Wasseranlagerung zusammen. Eine damit einhergehende Veränderung des Übergangsmoments gibt Anlaß zu der gesteigerten Intensität dieser Absorption.

Beide eben genannten Absorptionen sind auch im Spektrum der deuterierten Substanz zu beobachten. Während die Bande bei 2991 cm^{-1} ihre Lage nahezu beibehält (2980 cm^{-1} im deuterierten System), liegt die $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ Bande (3270 cm^{-1} beim protonierten System) im deuterierten System bei 2422 cm^{-1} (Abb. 25).

Bei hoher Luftfeuchtigkeit werden Banden bei 2400 cm^{-1} , 2368 cm^{-1} und 2302 cm^{-1} (85 %LF) beobachtet, weiterhin taucht ein Bandenpaar bei 2095 und 2042 cm^{-1} auf.

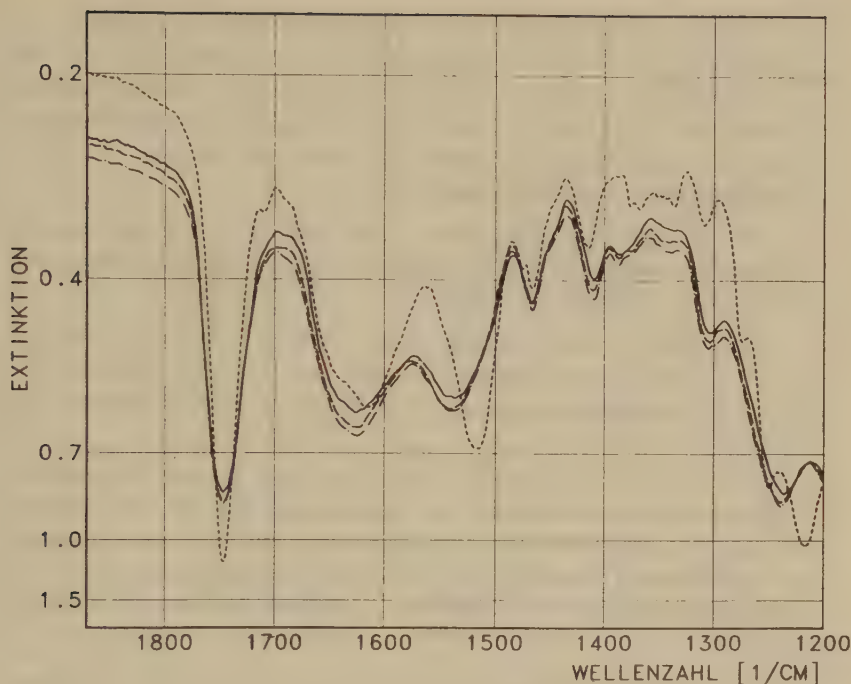


Abb. 20:

PSE

———— 11% LF, ———— 29% LF, - - - - 44% LF
 - · - · - 57% LF

Die Bandenbreite der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Schwingung bei 1747 cm^{-1} (Abb. 20) nimmt mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ab.

Im Bereich $1640 - 1600\text{ cm}^{-1}$ sollte die $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ Schwingung zu finden sein. Beobachtet wird eine breite Bande im Bereich 1680 bis 1580 cm^{-1} . In diesem Bereich liegen $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$, $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ und $\delta(\text{H}_2\text{O})$. Diese Bande nimmt zunächst an Intensität zu, spaltet danach in zwei Komponenten bei 1642 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-) + \delta(\text{H}_2\text{O})$) und 1615 cm^{-1} ($\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$) auf. Gleichzeitig verschiebt sich die $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$ Bande (44 - 57 % LF) sprunghaft von 1540 nach 1519 cm^{-1} .

Bei Systemen mit längeren $-\text{CH}_2-$ Ketten findet man im allgemeinen eine Aufspaltung der $-\text{CH}_2-$ Deformationsbanden. Man erklärt dies mit einer Wechselwirkung benachbarter $-\text{CH}_2-$ Gruppen (Lit. 57). Die Bande bei höheren Wellenzahlen (1477 cm^{-1}) kann $-\text{CH}_2-$ Gruppen zufälliger Anordnung (random) zugeordnet werden, während die Bande bei 1467 cm^{-1} $-\text{CH}_2-$ Gruppen in trans-Konformation entspricht.

Bei niedrigen Hydratationsgraden findet man die Bande bei kleineren Wellenzahlen während bei hohem Wassergehalt der Filme die Bande mit größeren Wellenzahlen an Intensität überwiegt.

Die $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande verschiebt sich von 1409 cm^{-1} (11 %LF) nach 1417 cm^{-1} (52 %LF), ein Bandenpaar bei 1388 und 1377 cm^{-1} , wahrscheinlich C-C-H Deformationsschwingungen, verlagert sich bei 57 %LF nach 1377 und 1369 cm^{-1} .

Bei 1344 und 1305 cm^{-1} findet man zwei Banden, die von der Carbonsäuregruppe hervorgerufen sind. Es ist bekannt, daß dieses Bandenpaar in Lage und Intensität sehr stark von der Umgebung der Carbonsäuregruppierung (Wasserstoffbrücke) beeinflußt wird. Dabei hat die Absorption bei höheren Wellenzahlen normalerweise mehr $\delta(\text{OH})-$, die andere mehr $\nu(\text{C}-\text{O})-$ Charakter (Lit. 70).

In Abb. 21 ist zu sehen, daß sich die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande mit zunehmender Luftfeuchtigkeit unter weiterer Abnahme der Halbwertsbreite nach 1741 cm^{-1} verschiebt. Hiermit wird bei hoher Luftfeuchtigkeit die intramolekulare $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Wasserstoffbrücke etwas gelockert.

Bei 85 %LF verschiebt sich die $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ Absorption sprunghaft von 1519 cm^{-1} nach 1509 cm^{-1} . Dies zeigt an, daß die Wasserstoffbrücken, die die NH_3^+ Gruppen ausbilden, wesentlich schwächer werden. Offensichtlich brechen die intermolekularen $\text{NH}_3^+\cdots\text{OP}$ Brücken auf. An die NH_3^+ Gruppe ist nach diesem Übergang Wasser gebunden.

Die mit der Hydratisierung einhergehende Zunahme der Bande bei 1477 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$ random), und die fast verschwindende Absorption bei 1467 cm^{-1} ($-\text{CH}_2-$ trans) belegt, daß die Beweglichkeit dieser Gruppierungen mit steigendem Wassergehalt zunimmt.

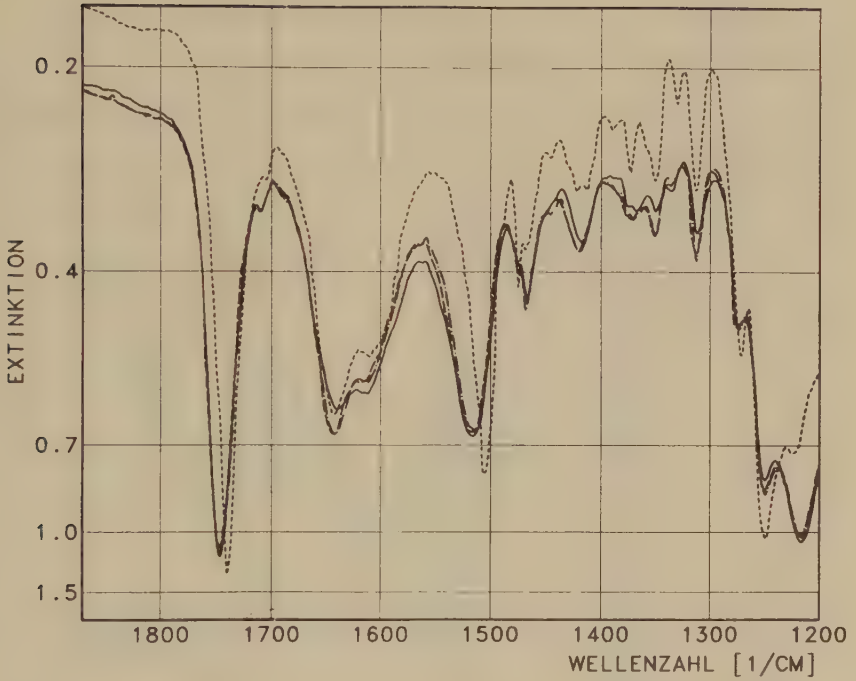


Abb. 21:

PSE

—— 66% LF, ——— 75% LF, ——— 85% LF,
----- 91% LF

Die Absorptionen der Carbonsäuregruppe bei 1344 und 1305 cm^{-1} mit $\delta(\text{OH})$ und mit $\nu(\text{C}-\text{O})$ Charakter werden durch diesen Effekt überlagert, was die Zuordnung erschwert. Die Bande bei 1344 cm^{-1} spaltet bei 66 %LF in zwei Komponenten bei 1351 und 1338 cm^{-1} auf.

Tabelle 2.2:

Zuordnung der PSE - Schwingungen

Wellenzahl (cm^{-1})			Schwingung	Lit.
11	57	85	% LF	
1747	1747	1742	$\nu(\text{C}=\text{O})$	
1625	1640	1640	$\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-) + \delta(\text{H}_2\text{O})$	73
breit	1615	1613	$\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$	74
1540	1519	1509	$\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$	
	1477	1477	$\delta(\text{CH}_2)$ random	71
1467	1467	1467	$\delta(\text{CH}_2)$ trans	71
1447	1447	1447	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3)$	
1409	1417	1423 } 1415 }	$\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$	
1387	1377	1376	$\delta(\text{C}-\text{H})$	
1377	1369	1356	$\delta(\text{C}-\text{H})$	
1344	1351	1354 } 1332 }	Schwingungen mit $\nu(\text{C}-\text{O})$ und $\delta(\text{OH})$	
1305	1310	1315 }	Charakter	

Die im Bereich 1300 bis 800 cm^{-1} stark dominierenden Phosphatbanden werden durch die Wasseraufnahme des Filmes stark beeinflusst. Eine breite Absorption bei 1238 cm^{-1} ist von der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingung hervorgerufen. Von dieser starken Absorption wird die darunterliegende $\nu(\text{P}=\text{O})$ Schwingung, die in Lit. 80 bei 1252 cm^{-1} gefunden wurde, verdeckt.

Beim Übergang von 44 nach 57 %LF verändert sich das Spektrum der Phosphatbanden sprunghaft. Entsprechende Veränderungen wurden vorher schon bei den Banden der Aminogruppe (z.B. $\delta(\text{NH}_3^+)$) beobachtet. Eine bis dahin verdeckte Bande erscheint bei 1276 cm^{-1} .

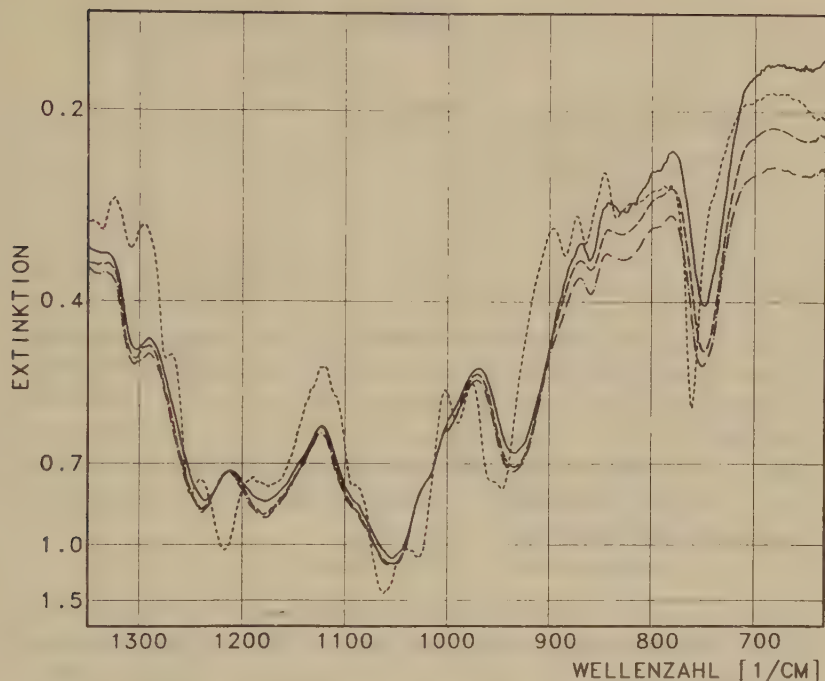


Abb. 22:

PSE

———11% LF, ———29% LF, ———44% LF
 -----57% LF

Die Bande bei 1250 cm^{-1} wird von $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Gruppen verursacht, die kräftige intermolekulare Wasserstoffbrücken mit NH_3^+ Gruppen benachbarter PSE-Moleküle ausbilden. Diese Absorption nimmt beim Übergang von 44 nach 57 %LF stark ab. Dafür taucht bei 1218 cm^{-1} eine intensive Bande auf, verursacht von $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingungen, an die zusätzlich ein Wassermolekül gebunden ist. Dieses Wassermolekül ist mit einem freien Elektronenpaar an die NH_3^+ Gruppe gebunden, gleichzeitig ist eine Wechselwirkung des Wasserprotons mit der Phosphatgruppe möglich. Die Bande der OH-Valenzschwingung dieses Wassermoleküls erscheint bei $3200 - 3100\text{ cm}^{-1}$ (Strukturwasser).

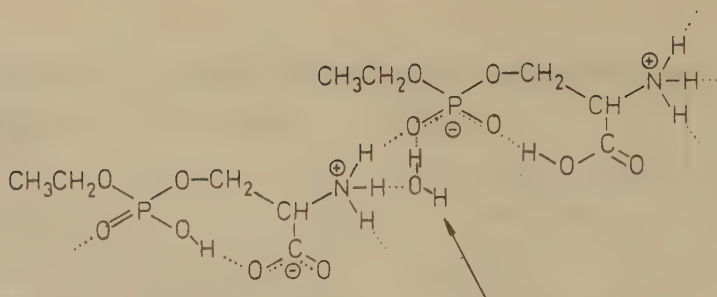


Abb. 23:

Einlagerung von Wasser zwischen benachbarte PSE - Moleküle (Strukturwasser)

Zuordnungen der Estergruppe des Phosphats ($P-OEt$) konnten vorgenommen werden, da diese Absorptionen relativ unabhängig von den jeweiligen Substituenten der Phosphorsäure immer nahezu an derselben Stelle auftreten. In Lit. 68 wird die Aufspaltung der $\nu(PO-C)$ Schwingungen in eine sym. bzw. antisym. Komponente diskutiert. Man findet im PSE System eine Absorption bei 1180 cm^{-1} die der $\nu_{as}(RO-P-OEt)$ Schwingung ($R = \text{Serinrest}$) entspricht. Die dazugehörige symmetrische Schwingung liegt bei 1028 cm^{-1} .

Bei 991 cm^{-1} befindet sich die $\nu(C-N)$ Schwingung.

Die Intensität der $\nu_s(RO-P-OEt)$ Absorption wird bei der Konfiguration, die sich bei 52 %LF bildet, größer. Dabei zeigt sich, daß sich diese Gruppierung unter diesen Bedingungen in einer relativ unsymmetrischen Umgebung befindet. Die $\nu(P-(OH))$ Bande, die man bei 938 cm^{-1} beobachtet, verschiebt sich beim Übergang von 44 nach 57 %LF unter Aufspaltung nach größeren Wellenzahlen (959 und 946 cm^{-1}).

Die intensive Bande bei 751 cm^{-1} , die sich bei 52 %LF unter Abnahme der Halbwertsbreite nach 761 cm^{-1} verschiebt, konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Sicher ist nur, daß die $\delta_s(C-N-H)$ Absorption, die üblicherweise in diesem Bereich auftritt, daran beteiligt ist.

Die Absorption bei 545 cm^{-1} (Abb. 28) wird von manchen Autoren (Lit. 68) einer gauche-gauche Konformation der Phosphatgruppe zugeordnet. Wie aus Einkristall-Röntgenstrukturuntersuchungen hervorging, ist dies die am meisten verbreitete Konformation der Phosphodiester.

Abb. 24 zeigt die PSE Absorptionen im Phosphatbereich bei höherer Luftfeuchtigkeit. Generell läßt sich bei allen Banden eine Abnahme der Halbwertsbreite einhergehend mit einer größeren maximalen Extinktion

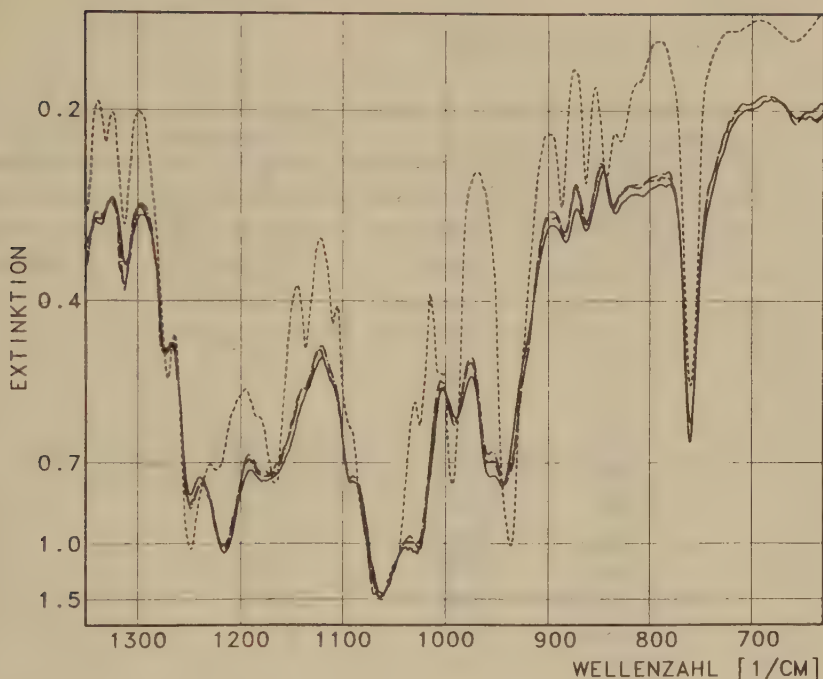


Abb. 24:

PSE

—— 66% LF, ---- 75% LF, -.-.- 85% LF,
 91% LF

beobachten. Dies läßt den Schluß zu, daß mit zunehmendem Wassergehalt des Filmes die PSE Struktur durch Wasseranlagerung aufgelockert wird, die sterischen Einflüsse (starke Wasserstoffbrücken mit der Umgebung) auf die Schwingungen werden geringer.

Beim Übergang zu hohen Luftfeuchtigkeiten verschwindet die Bande bei 1218 cm^{-1} wieder. Dafür findet man eine reativ scharfe Bande bei 1250 cm^{-1} , die von der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingung verursacht ist. Sie erscheint nach dem Aufbrechen der kräftigen intermolekularen $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{NH}_2 \cdots \text{HOP}$ Brücke bei etwas höheren Wellenzahlen, denn nun sind die Phosphatgruppen über relativ schwache Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen verknüpft. Die Bande bei $3200 - 3100\text{ cm}^{-1}$, Kriterium für stark gebundene Wassermoleküle, belegt diese Interpretation.

Tabelle 2.3:

Zuordnung der PSE - Schwingungen

Wellenzahl (cm^{-1})			Schwingung	Lit.
11	57	85	% LF	
maskiert	1276	1274		
1238	1250 (w)	1250 (s)	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$	77 - 79
breit	1218 (s)	1224 (w)	darunter $\nu(\text{P}=\text{O})$	
1180	1180	1185	$\nu_{\text{as}}(\text{RO}-\text{P}-\text{OEt})$	75
	1110	1110		
	1092	1092		
1054	1065	1065	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$	
	1028	1028	$\nu_{\text{s}}(\text{RO}-\text{P}-\text{OEt})$	
	990	992	$\nu(\text{C}-\text{N})$	76
	959			
938	946	936	$\nu(\text{P}-(\text{OH})\cdots)$	
	884	884		
860	868	868		
751	761	761		
	567	570	$\delta(\text{O}-\text{P}-\text{O})$	
	543			
514	514	514		

R = Serinrest

Bei Zunahme der Luftfeuchtigkeit verliert auch die Bande bei 1028 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{RO}-\text{P}-\text{OEt})$) an Intensität, was anzeigt, daß diese Gruppierung wieder in eine symmetrischere Umgebung kommt. Die Aufspaltung der $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Banden (946 und 969 cm^{-1}) verschwindet ebenfalls. Zurück bleibt eine Absorption bei 936 cm^{-1} .

Verschwunden ist auch die $\delta(\text{O}-\text{P}-\text{O})$ Schwingung bei 543 cm^{-1} , während die $\delta(\text{O}-\text{P}-\text{O})$ Absorption bei 514 cm^{-1} zwei schwache Satelliten bei 535 cm^{-1} und 494 cm^{-1} aufweist (Abb. 28).

3.1.2. PSE deuteriert

Die Infrarotspektren dieser Substanz wurden mir von I. Kempf (Lit. 19) zur Verfügung gestellt. Die Auswertung soll einer fundierten Zuordnung der PSE Banden dienen. Sie wurden in diese Arbeit aufgenommen, da eine möglichst genaue Zuordnung der Absorptionen ausschlaggebend für die Interpretation der Ergebnisse ist.

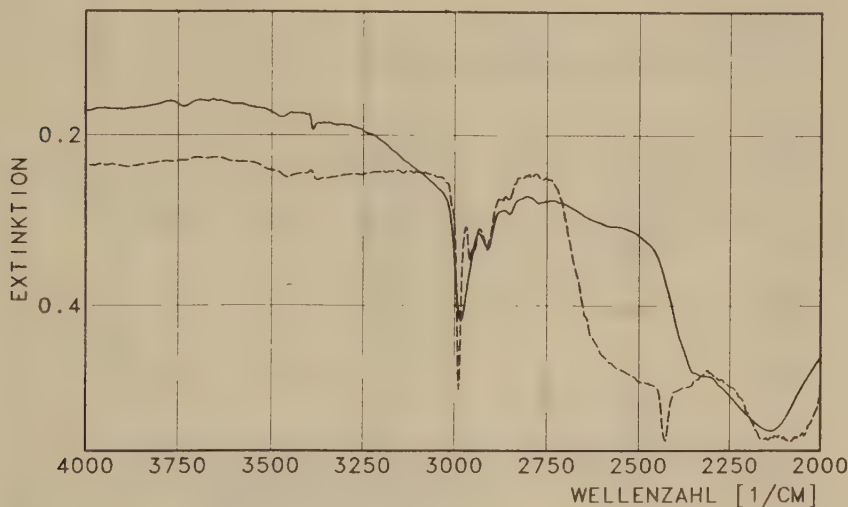


Abb. 25:

PSE deuteriert

———11% LF, ----75% LF

Bei 2980 cm^{-1} findet man eine $\nu(\text{C}-\text{H})$ Schwingung, deren Intensität bei 75 %LF stark erhöht ist. Dies läßt sich mit einer Strukturumwandlung im Film (siehe Kap. 3.1.1) erklären, die bei 75 %LF mit einem Aufbrechen der intermolekularen $\text{ND}_3^+ \cdots \text{OP}$ Wasserstoffbrücke einhergeht. Im Fall der deuterierten Probe brechen die Brücken hiernach bereits bei 75 %LF auf.

Eine breite Bande bei 2136 cm^{-1} wird von der $\nu_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$ Schwingung hervorgerufen. Bei 75 %LF beobachtet man eine breite D_2O Absorption im Bereich $2700 - 2250\text{ cm}^{-1}$, darunter eine spitze Bande bei 2422 cm^{-1} . Die spitze Bande entspricht, bei Berücksichtigung des H/D Isotopiefaktors, der Bande bei 3270 cm^{-1} im H_2O System und wird somit der $\nu_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$ Schwingung zugeordnet, wobei an allen ND-Gruppen D_2O Moleküle gebunden sind. Die ND_3^+ Gruppen befinden sich damit in einer sehr symmetrischen Umgebung.

Bei erhöhter Luftfeuchtigkeit spaltet die breite 2136 cm^{-1} Absorption in zwei Komponenten bei 2212 und 2072 cm^{-1} auf.

Tabelle 3.1:

Zuordnung der PSE - Schwingungen (deutertiert)

Wellenzahl (cm^{-1})		Schwingung
11	75	% LF
—	2980	$\nu(\text{C} - \text{H})$
2956	2956	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)$
2919	2919	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2870	2870	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
2852	2852	$\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$
—	2700 - 2250	$\nu(\text{D}_2\text{O})$
—	2422	$\nu_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$ schwache Bindung an D_2O symmetrische Umgebung
2136	2212	} $\nu_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$
—	2072	

Abb. 26 zeigt das Spektrum des deutertierten PSE im Bereich 1800 bis 1200 cm^{-1} . Die $\nu(\text{C} = \text{O})$ Absorption liegt bei 1742 cm^{-1} (11 %LF) und verschiebt sich mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nach 1735 cm^{-1} . Im Vergleich zur protonierten Substanz ist die $\nu(\text{C} = \text{O})$ Schwingung etwas zu tieferen Wellenzahlen verschoben.

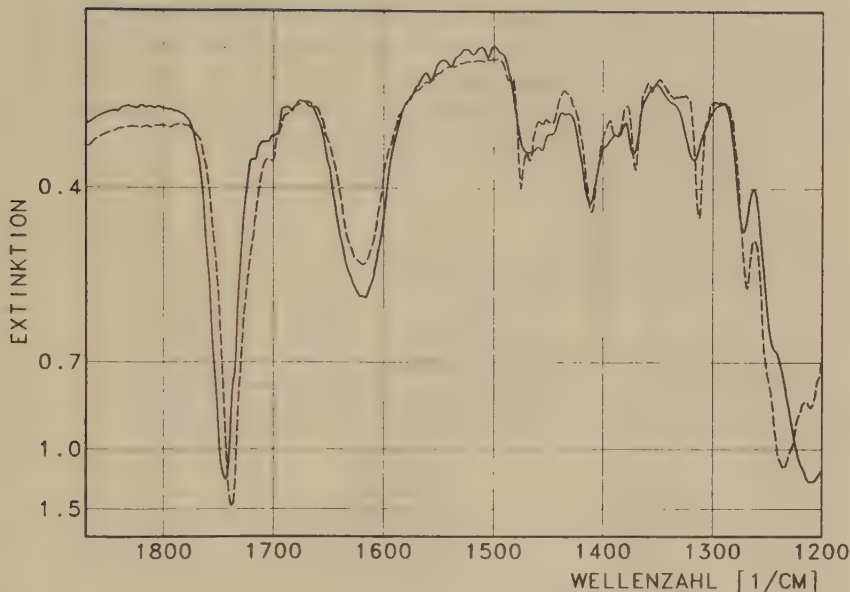


Abb. 26:

PSE deuteriert

— 11% LF, ---- 75% LF

Die antisymmetrische Carboxylatschwingung ist nun ohne Überlagerung durch NH_3^+ -Deformationsschwingungen bei 1618 cm^{-1} zu beobachten. Dies zeigt, daß zumindest in der D_2O hydratisierten Probe die Struktur $\text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ der intramolekularen Brücke beträchtliches Gewicht hat. Auffallend ist, daß das Protonen-transfer-Gleichgewicht bei hoher Luftfeuchtigkeit etwas stärker auf die Seite der Carbonsäuregruppierung verschoben ist, wie aus der leichten Zunahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$ und der Abnahme der $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ -Bande bei 75 % Luftfeuchtigkeit zu ersehen ist.

Die CH_2 -Deformationsschwingungen findet man bei 1475 ($\delta(\text{CH}_2)$ random) und 1470 cm^{-1} ($\delta(\text{CH}_2)$ trans). Bei höherem D_2O Gehalt des Filmes zeigt eine Intensitätszunahme der $\delta(\text{CH}_2)$ random Bande eine Auflockerung der PSE Struktur.

Relativ konstant ist hingegen die $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1411 cm^{-1} . Eine Absorption bei 1314 cm^{-1} wird der $\nu(\text{C}-\text{O})$ Schwingung der Carbonsäuregruppe zugeordnet, da sie zwischen den beiden Banden mit $\nu(\text{C}-\text{O})$ - und $\delta(\text{O}-\text{H})$ -Charakter der mit H_2O hydratisierten Probe liegt. Die Halbwertsbreite dieser Bande nimmt mit zunehmender Hydratation stark ab.

Tabelle 3.2:

Zuordnung der PSE - Schwingungen (deutertiert)

Wellenzahl (cm^{-1})		Schwingung
11	75	% LF
1742	1735	$\nu(\text{C}=\text{O})$
1618	1618	$\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$
1475	1475	$\delta(\text{CH}_2)$ random
1470	1470	$\delta(\text{CH}_2)$ trans
1411	1411	$\nu_s(\text{CO}_2^-)$
1387	1387	
1372	1370	$\delta(\text{C}-\text{H})$
1314	1310	$\nu(\text{C}-\text{O})$

Bei der Probe mit 11 %LF findet man eine breite intensive Absorption bei 1211 cm^{-1} , die durch die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingung verursacht ist. Das Strukturwasser, das man bei der H_2O hydratisierten Probe erst bei 57 %LF findet, ist hier bereits bei 11 %LF eingelagert. Die $\nu(\text{O}-\text{D})$ Schwingung dieses Wassers beobachtet man als Schulter bei 2350 cm^{-1} .

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit verschiebt sich die Absorption der $\nu(\text{PO}_2^-)$ Schwingung nach 1233 cm^{-1} (75 %LF). Dies zeigt, daß in der D_2O hydratisierten Probe bereits bei dieser Luftfeuchtigkeit die intermolekularen $\text{ND}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücken aufgebrochen sind. Dadurch wird die $\delta_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$ Absorption bei 1185 cm^{-1} sichtbar, die im Film bei 11 %LF durch eine

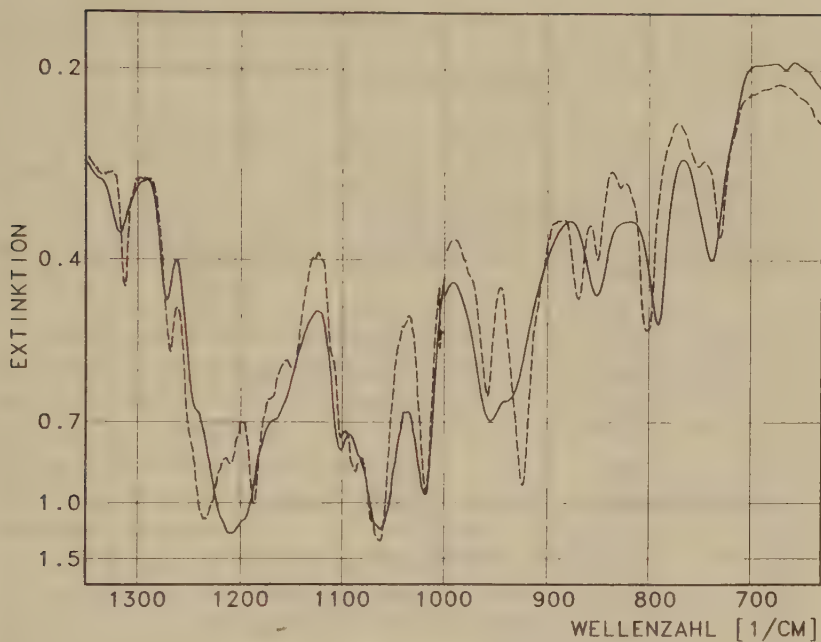


Abb. 27:

PSE deuteriert

——— 11% LF, - - - - 75% LF

Phosphatbande verdeckt ist. Bei 1145 cm^{-1} findet man eine Bande, die der $\delta_s(\text{ND}_3^+)$ Schwingung zuzuordnen ist, denn sie wird bei der H_2O hydratisierten Probe nicht beobachtet.

Tabelle 3.3:

Zuordnung der PSE - Schwingungen (deutერი)rt)

Wellenzahl (cm^{-1})		Schwingung
11	75	% LF
1240 (sh)	verdeckt	$\nu(\text{P} - \text{O})$
1211	1233	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$
verdeckt	1185	$\delta_{\text{as}}(\text{ND}_3^+)$
1164 (sh)	1164	$\nu_{\text{as}}(\text{RO} - \text{P} - \text{OEt})$
	1145	$\delta_{\text{s}}(\text{ND}_3^+)$
1101	1101	
1084	1084	
1062	1062	$\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$
1018	1018	
953	956	$\nu(\text{C} - \text{N})$
933	924	$\nu(\text{P} - (\text{OH}))$
	870	
850	848	
552	557	$\delta(\text{O} - \text{P} - \text{O})$
504	504	$\delta(\text{O} - \text{P} - \text{O})$

R = Serinrest

3.2. Übersicht über die PSE Systeme

Über das PSE Zwitterion lassen sich zusammenfassend folgende Aussagen machen:

Es ist im Zwitterion eine $\text{COOH} \cdots {}^-\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Wasserstoffbrücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit ausgebildet. Dies ergibt sich aus folgenden Befunden:

Untersuchungen von Papakostidis an O-Phospho-L-serin-P-methylester in wäßriger Lösung ergaben, daß alle Absorptionen der bei beiden Grenzstrukturen auftretenden Banden im IR-Spektrum zu beobachten sind. Er konnte insbesondere die $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Schwingung, sowie die $\nu(\text{P}=\text{O})$ - und die ν_{as} und $\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$ -Schwingung zuordnen (Lit. 15).

Diese Absorptionen und das gleichzeitige Auftreten einer kontinuierlichen Absorption im Bereich $3500-1600 \text{ cm}^{-1}$ lassen auf die Anwesenheit einer Wasserstoffbrücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit schließen.

Das Gleichgewicht der Brücke ist etwas zugunsten der Carbonsäurestruktur verschoben, das Doppelminimum-Protonenpotential ist mithin relativ unsymmetrisch. Dies äußert sich in einer Abnahme der kontinuierlichen Absorption hin zu kleineren Wellenzahlen (ab etwa 1600 cm^{-1}).

Man stellte weiterhin fest, daß bei Anwesenheit starker Wasserstoffbrücken die CH-Deformationsschwingungen mit Protonenübergängen in der intramolekularen Wasserstoffbrücke in Wechselwirkung treten können. Die Folge ist eine starke Verbreiterung dieser Banden, verursacht durch die Ankopplung ihrer Übergangsmomente an die Protonenbewegung der Wasserstoffbrücke, was soweit gehen kann, daß die $\delta(\text{C}-\text{H})$ Banden teilweise in der kontinuierlichen Absorption aufgehen.

Im Unterschied zu allen später noch zu besprechenden Systemen zeigt das Zwitterionensystem keine starke Wasseraufnahme zwischen 29 und 91 %LF.

Es treten zwei Strukturänderungen, die erste von 44 nach 57 %LF, die zweite bei Luftfeuchtigkeiten größer als 75 % auf. Bei ersterer werden die NH_3^+ und

PO_2^- Gruppen der intermolekularen $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Wasserstoffbrücke zusätzlich durch Strukturwasser verknüpft. Die zweite Veränderung ist durch das Aufbrechen dieser Brücke bei Luftfeuchtigkeiten größer als 75 % gekennzeichnet.

1. Übergang

Man beobachtet eine Abnahme der kontinuierlichen Absorption, wie in Abb. 28 dargestellt. Das Gleichgewicht der intramolekularen $\text{COOH} \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Wasserstoffbrücke verschiebt sich zugunsten der Carbonsäurestruktur. Damit wird das Brückenpotential unsymmetrischer, was die Abnahme der kontinuierlichen Absorption erklärt.

Durch Anlagerung des Strukturwassers wird die intermolekulare $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Wasserstoffbrücke geschwächt. Demnach wird durch Ausbildung von zwei Wasserstoffbrücken zu einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe das Gleichgewicht in der intramolekularen Brücke zugunsten der Carbonsäurestruktur verschoben. Die Einlagerung des Strukturwassers bewirkt eine Verschiebung der $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ Absorption zu geringfügig tieferen Wellenzahlen. Die Phosphatbande $\nu(\text{P} - (\text{OH}))$ verschiebt sich unter Aufspaltung von 938 cm^{-1} nach 959 und 946 cm^{-1} .

Die Umgebung der Esterschwingungen der Phosphatgruppe wird unsymmetrischer, was sich in einer Intensitätszunahme der $\nu_{\text{s}}(\text{RO} - \text{P} - \text{OEt})$ Schwingung bei 1028 cm^{-1} und einer Abnahme der $\nu_{\text{as}}(\text{RO} - \text{P} - \text{OEt})$ Schwingung bei 1185 cm^{-1} bemerkbar macht. Die $\nu(\text{C} - \text{N})$ Schwingung bei 991 cm^{-1} gewinnt an Intensität. Die $\delta(\text{O} - \text{P} - \text{O})$ Schwingung bei 514 cm^{-1} spaltet in drei Komponenten bei 567, 543 und 514 cm^{-1} auf.

2. Übergang

Man beobachtet eine weitere Abnahme der kontinuierlichen Absorption, wie in Abb. 28 zu sehen ist. Dies ist durch die größere Anzahl der Wassermoleküle in der Nachbarschaft der intramolekularen $\text{COOH} \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Wasserstoffbrücke verursacht. Weil an die Carbonylgruppe der Carbonsäurestruktur Wasser angelagert wird, beobachtet man eine geringfügige Verschiebung der $\nu(\text{C} = \text{O})$ Absorption zu kleineren Wellenzahlen (1742 cm^{-1}).

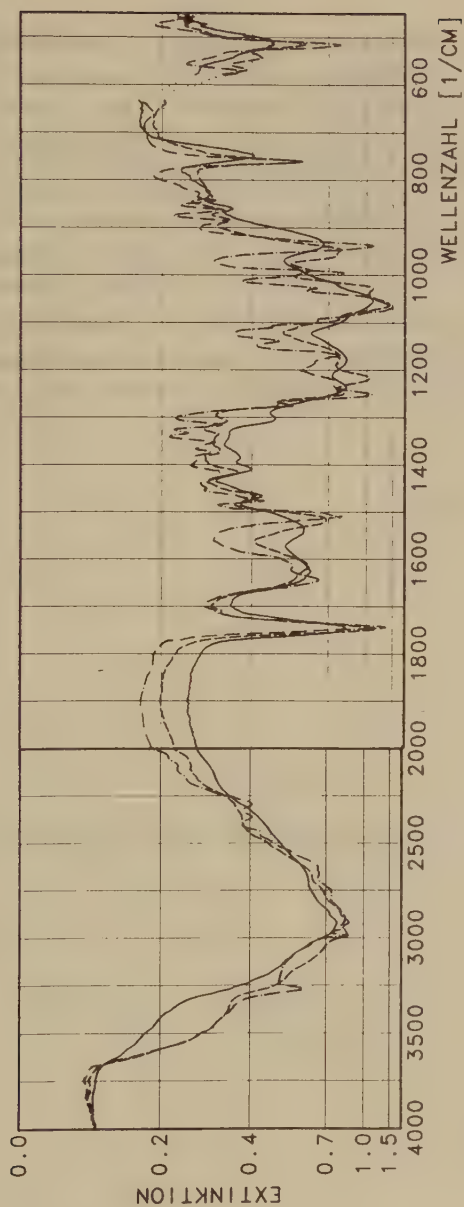


Abb. 28:

PSE

—— 11% LF, ---- 57% LF, - · - · - 85% LF

Die Bande des Strukturwassers um 3100 cm^{-1} verschwindet wieder und eine scharfe $\nu(\text{NH}_3^+)$ Schwingung bei 3270 cm^{-1} zeigt, daß sich nun NH_3^+ Gruppen durch Anlagerung von Hydratwasser in einer vollständig symmetrischen Umgebung befinden. Gleichzeitig nimmt die Halbwertsbreite der $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ Schwingung (1509 cm^{-1} bei 85 %LF) noch weiter ab.

Durch das Aufbrechen der intermolekularen Brücke wird die C-N Bindung polarer, was zu einer Intensitätszunahme der $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung führt. Die Bande bei 2980 cm^{-1} wird einer $\nu(\text{C}-\text{H})$ Schwingung zugeordnet.

Ebenfalls als Folge der Aufbrechens der $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücken verschiebt sich die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Absorption wieder nach größeren Wellenzahlen, da die Wasserstoffbrücken der PO_2^- Gruppierung zu Wassermolekülen schwächer sind.

3.3.1. PSE + LiOH

Im Gegensatz zum PSE Zwitterion nimmt das System mit Li^+ mit steigender Luftfeuchtigkeit zunehmend Wasser auf (Bande bei 3400 cm^{-1} in Abb. 29). Im Bereich $3000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ sind keinerlei Banden von Ober- oder Kombinationsschwingungen festzustellen.

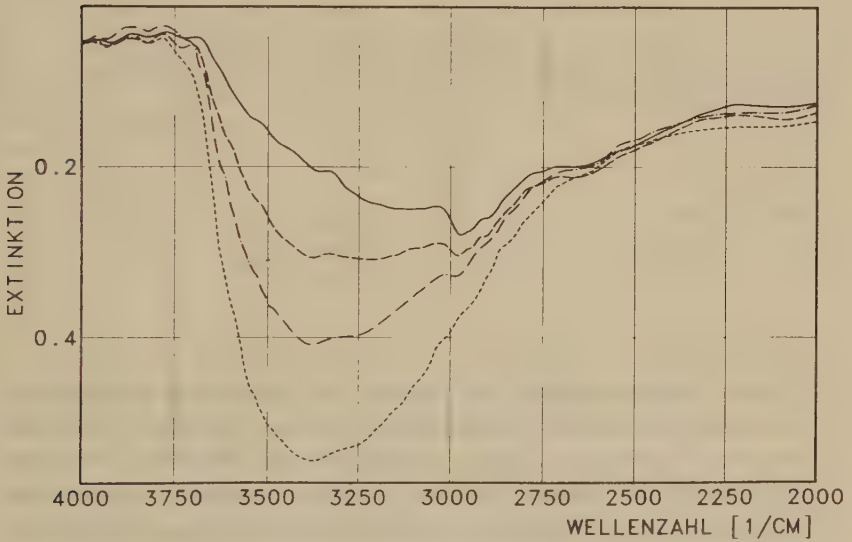


Abb. 29:

PSE + LiOH

—— 11% LF, ——— 57% LF, - - - - 75% LF
- · - · - 85% LF

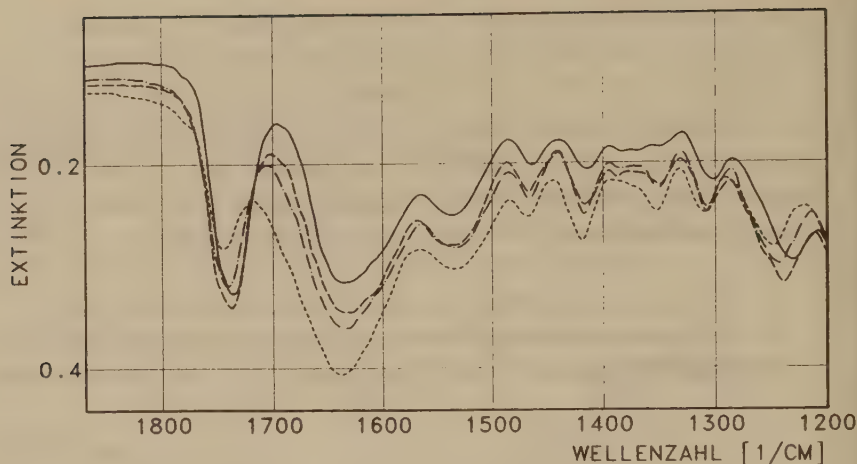


Abb. 30:

PSE + LiOH

——— 11% LF, ——— 57% LF, - - - - 75% LF
 ····· 85% LF

Bei 11 %LF ist die kontinuierliche Absorption, die man beim PSE System im Bereich $3000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet, relativ schwach (Abb. 45). Dies rührt davon her, daß das Protontransfer-Gleichgewicht der (I) $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ (II) Brücken durch das Lithiumion weitgehend zugunsten der Grenzstruktur (I) verschoben ist. Dies wird durch die Banden der beteiligten Gruppierungen bestätigt. Man findet $\nu(\text{C}=\text{O})$ als intensive Bande bei 1735 cm^{-1} , $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ als schwache Bande bei 1416 cm^{-1} , $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ bei 1234 cm^{-1} und $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ sehr verbreitert und sehr schwach bei 930 cm^{-1} . Hiernach polarisieren die Lithiumionen die intramolekulare Brücke. Dies wird auch durch die Veränderungen der $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ Absorption in Abhängigkeit vom Hydratationsgrad bestätigt.

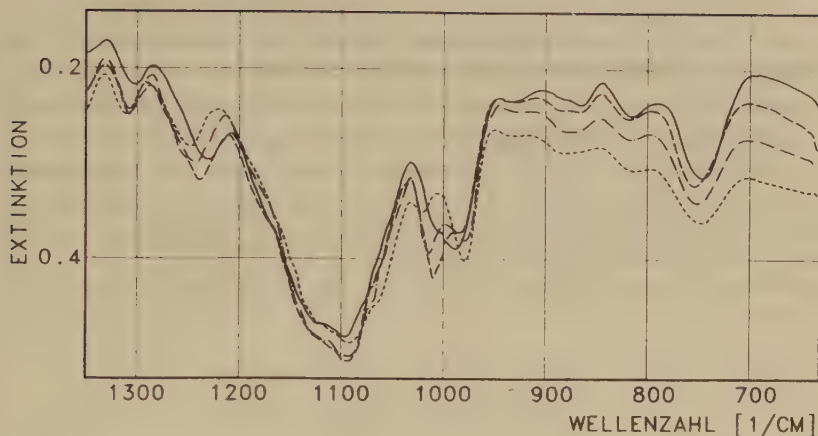


Abb. 31:

PSE + LiOH

——— 11% LF, ——— 57% LF, - - - - 75% LF
 ····· 85% LF

Die $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ Absorption bei 1234 cm^{-1} (11 %LF) verschiebt sich zunächst unter Zunahme ihrer Intensität nach 1240 cm^{-1} (57 %LF). Bei weiterer Zunahme der Luftfeuchtigkeit nimmt die Intensität der Bande wieder ab, ihr Maximum verschiebt sich nach 1248 cm^{-1} (85 %LF).

Dies alles zeigt, daß das Lithiumion zunächst an das freie Sauerstoffatom der Phosphatgruppe gebunden ist. Mit zunehmender Hydratisierung des Filmes wird es durch die Einlagerung von Hydratwasser gelockert. Die Intensitätsabnahme könnte durch die im folgenden diskutierte Zerstörung der intramolekularen Wasserstoffbrücke bedingt sein.

Durch Zugabe von LiOH zum PSE Zwitterion besteht die Möglichkeit, daß PSE an zwei Stellen, der NH_3^+ -Gruppierung oder der intramolekularen Wasserstoffbrücke deprotoniert wird. Auch ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten kann sich einstellen.

Aus den Spektren in Abb. 30 ist zu ersehen, daß die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1735 cm^{-1} mit zunehmender Hydratisierung abnimmt. Das Maximum verschiebt sich hierbei von 1735 cm^{-1} (11 %LF) nach 1742 cm^{-1} (85 %LF). Gleichzeitig nimmt die Bande bei 1638 cm^{-1} , die sich aus $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ und $\delta(\text{H}_2\text{O})$ zusammensetzt, in ihrer Intensität zu. Wie die $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ bei 1638 cm^{-1} gewinnt auch die $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1416 cm^{-1} mit zunehmender Luftfeuchtigkeit an Intensität.

Die Abnahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$, ebenso wie die Zunahme der $\nu(\text{CO}_2^-)$ Bande zeigen, daß intramolekulare Wasserstoffbrücken durch Neutralisation zerstört werden.

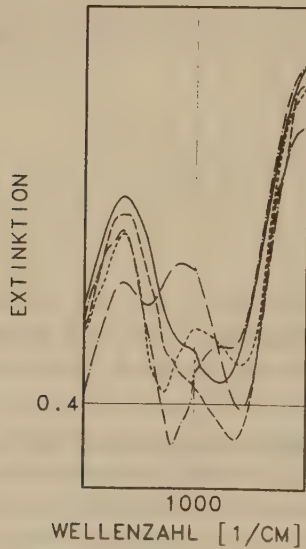


Abb. 32:

PSE + LiOH ($1050 - 950\text{ cm}^{-1}$)

———— 11% LF, ----- 29% LF, -.-.-.- 57% LF

..... 75% LF, - - - - - 85% LF

Die in PSE als scharfe Bande bei 1519 cm^{-1} (57 %LF) auftretende $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ Schwingung ist hier als breite Absorption bei 1532 cm^{-1} sichtbar. An dieser breiten Bande sind die Veränderungen, von der die NH_3^+ Gruppe mit zunehmender Hydratation betroffen ist, nicht zu erkennen. Deutlich werden diese jedoch durch die $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung im Bereich $1050-950\text{ cm}^{-1}$ angezeigt. Die Banden bei 1019 und 978 cm^{-1} werden der $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung zugeordnet. Die höherliegende Bande entspricht dabei der $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung, während die zweite bei 978 cm^{-1} durch die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung hervorgerufen wird.

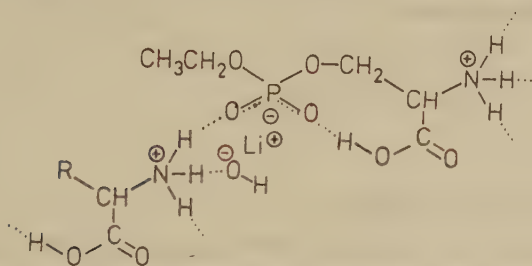


Abb. 33:

Konformation von PSE + LiOH

$\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ entsteht durch Deprotonierung der Aminogruppe durch das dem Zwitterion hinzugefügte LiOH:



Die Intensität der tieferliegenden Bande (978 cm^{-1}) nimmt zunächst bis 44 %LF zu, zwischen 44 und 57 %LF werden die Intensitäten der beiden Absorptionen sprunghaft vertauscht, sodaß plötzlich $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ als starke Absorption bei 1008 cm^{-1} erscheint und die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ nur noch als Schulter bei 988 cm^{-1} auftaucht.

Die Banden der Carbonsäuregruppe mit $\nu(\text{C}-\text{O})$ und mit $\delta(\text{O}-\text{H})$ Charakter verändern sich mit steigender Luftfeuchtigkeit ebenfalls. Die Schwingung mit mehr $\delta(\text{O}-\text{H})$ -Charakter erscheint bei 1357 cm^{-1} (57 %LF) während sich die Schwingung mit überwiegend $\nu(\text{C}-\text{O})$ -Charakter bei 1302 cm^{-1} nur leicht unter Zunahme der Intensität nach 1306 cm^{-1} (57 %LF) verschiebt.

Wird die Luftfeuchtigkeit über dem Film weiter gesteigert, verliert die Bande bei höheren Wellenzahlen wieder an Intensität und verschiebt sich nach 1019 cm^{-1} (85 %LF), während die andere Absorption an Intensität gewinnt (57–85 %LF) und von 988 nach 978 cm^{-1} wandert. Somit werden im Bereich 44–75 %LF viele Aminogruppen neutralisiert. Mit zunehmendem Wassergehalt werden diese von Wasser wieder protoniert.

Diese Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu:

Bei Zugabe von LiOH wird das PSE Zwitterion teilweise an der Carbonsäure-, teilweise an der Aminogruppe deprotoniert. Damit wird die intramolekulare Wasserstoffbrücke teilweise zerstört.

Das Lithiumion ist bei kleinem Hydratationsgrad so angelagert, wie es Abb. 33 zeigt. Es polarisiert einerseits die $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OH}^-$ Brücke so stark, daß das Proton an der Aminogruppe lokalisiert bleibt. Dies wird dadurch angezeigt, daß diese Brücke offensichtlich keine kontinuierliche Absorption verursacht. Andererseits polarisiert das Lithiumion die intramolekulare $\text{COOH} \cdots \text{OP}$ Brücke, sodaß sich das Proton ebenfalls bevorzugt an der Carbonsäuregruppe aufhält. Hiermit nimmt die Protonenpolarisierbarkeit dieser Brücke ab. Die Protonenstruktur, wie sie Abb. 33 zeigt, ist stark bevorzugt.

Bei Anwesenheit einer definierten Menge H_2O (57 %LF) verschiebt sich das $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$ Gleichgewicht teilweise auf die rechte Seite. Dies erklärt sich, da durch Wasseranlagerung an Li^+ das $\text{Li}^+ \text{OH}^-$ Ionenpaar getrennt wird. Damit steigt sprunghaft die Basizität des OH^- , was die beobachtete Gleichgewichtsverschiebung erklärt.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit wird das Kation weiter hydratisiert. Durch die größere Anzahl der jetzt vorhandenen Wassermoleküle wird die Aminogruppe wieder reprotoniert. Gleichzeitig wird das Proton in der intramolekularen $\text{COOH} \cdots \text{OP}$ Wasserstoffbrücke teilweise neutralisiert und die Brücke wird zerstört.

3.3.2. PSE + NaOH:

Das System PSE + NaOH zeigt eine ähnlich starke Wasseraufnahme wie schon bei Li^+ beobachtet. Bei 11 %LF ist die kontinuierliche Absorption, die man im Bereich $3000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet, deutlich zu erkennen (Abb. 45). Dies zeigt, daß die intramolekulare Wasserstoffbrücke bei Anwesenheit von Na^+ Protonenpolarisierbarkeit zeigt. Dies wird durch die Betrachtung der Banden der Gruppierungen bestätigt. $\nu(\text{C}=\text{O})$ findet man bei 1740 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ liegt bei 1234 cm^{-1} , $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ ist als ausgeprägte Bande bei 1414 cm^{-1} und $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ ebenfalls als deutliche Bande bei 930 cm^{-1} zu beobachten. Hiernach hat in diesem Fall die Protonengrenzstruktur (I) noch größeres Gewicht.

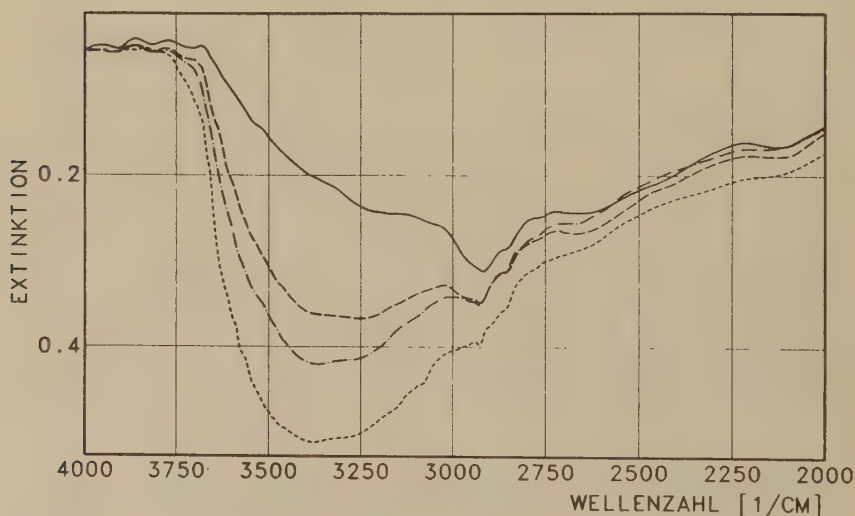
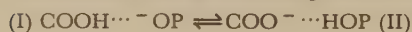


Abb. 34:

PSE + NaOH

————— 11% LF, ———— 44% LF, - - - - - 57% LF
 - · - · - 75% LF

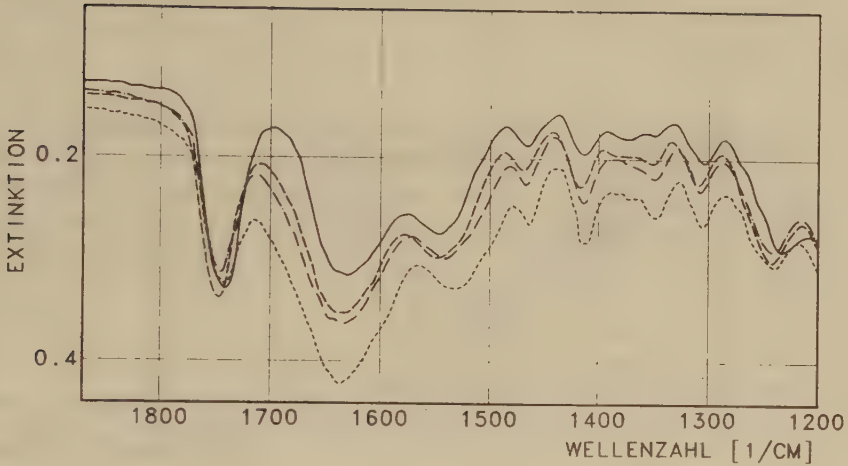


Abb. 35:

PSE + NaOH

———11% LF, ———44% LF, - - - -57% LF
- · - · -75% LF

Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1740 cm^{-1} nimmt mit steigender Luftfeuchtigkeit nur geringfügig ab. Dies zeigt, daß nur ein relativ kleiner Anteil der intramolekularen Brücken durch Neutralisation zerstört wird. Die geringere Neutralisation erklärt sich damit, daß die intramolekularen Wasserstoffbrücken weniger polarisiert und damit vermutlich etwas kräftiger sind. Erstaunlicherweise werden auch die NH_3^+ Gruppen nur zu einem relativ geringen Anteil neutralisiert. Dies zeigt wieder die $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung an. Die Bande der $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Gruppe bei 1020 cm^{-1} tritt im Vergleich mit der $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Gruppe bei 974 cm^{-1} nur als sehr schwache Bande auf.

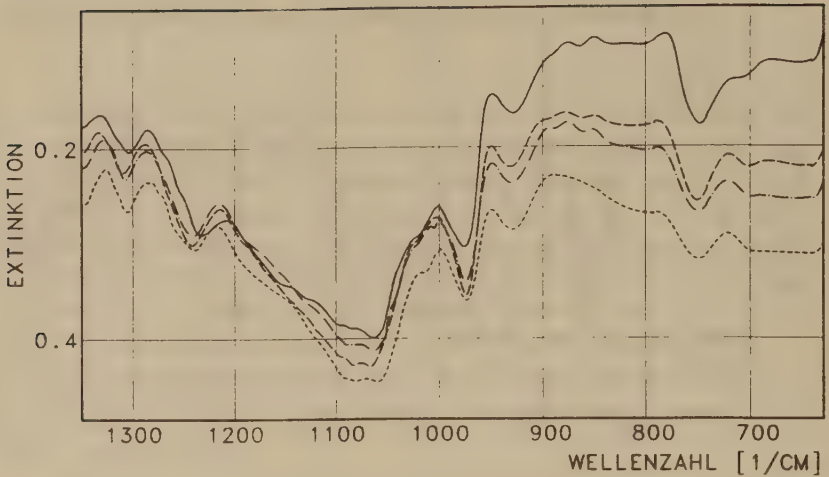


Abb. 36:

PSE + NaOH

——— 11% LF, ---- 44% LF, - · - · - 57% LF
····· 75% LF

Durch den größeren Radius kann das Natriumion die intramolekulare Brücke nicht so stark polarisieren. Es ist jedoch ebenfalls an der Phosphatgruppe anwesend und wird mit zunehmendem Hydratisierungsgrad gelockert, wie die vom Hydratationsgrad abhängige Lage der $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ Bande zeigt. Diese Bande wird bei 11 %LF bei 1234 cm^{-1} gefunden und verschiebt sich mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nach 1242 cm^{-1} .

Die OH^- Ionen liegen hydratisiert vor und verursachen durch die Fluktuation des Defektprotons in der H_3O_2^- Wasserstoffbrücke eine kontinuierliche Absorption, die sich auch nach kleineren Wellenzahlen erstreckt. Dies wird bei der Betrachtung des Spektren bei hohem Hydratationsgrad deutlich (Die Anhebung im Bereich unter 900 cm^{-1} ist durch die Torsionsschwingung der Wassermoleküle verursacht).

3.3.3. PSE + KOH:

Das Spektrum von PSE + KOH zeigt im Bereich $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ bereits bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten eine im Vergleich zu LiOH und NaOH Filmen deutlich höhere Wasseraufnahme. Außer den Banden der C-H Streckschwingungen im Bereich von $2980 - 2855 \text{ cm}^{-1}$ findet man bei 75 %LF Absorptionen bei 2696 und 2604 cm^{-1} .

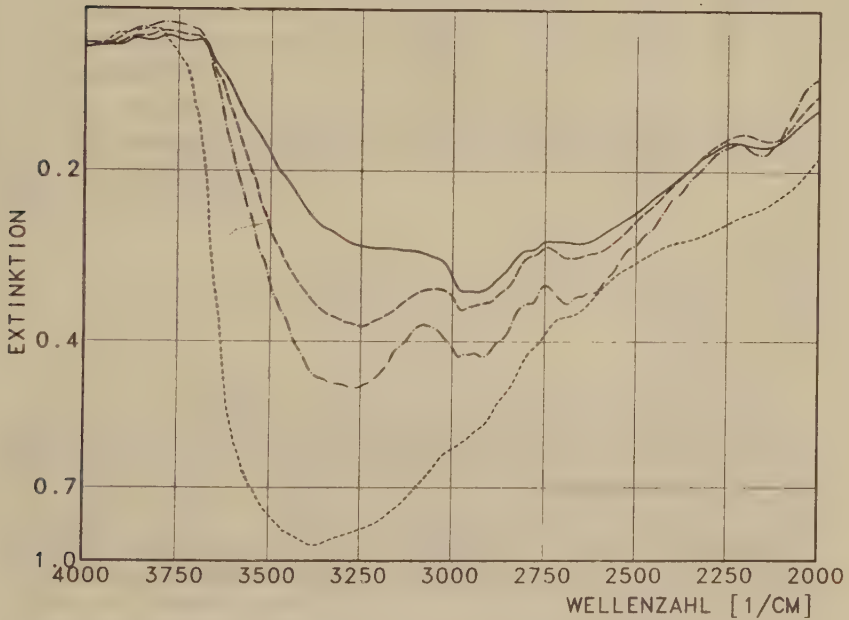


Abb. 37:

PSE + KOH

——— 11% LF, --- 29% LF, - · - · - 75% LF

----- 85% LF

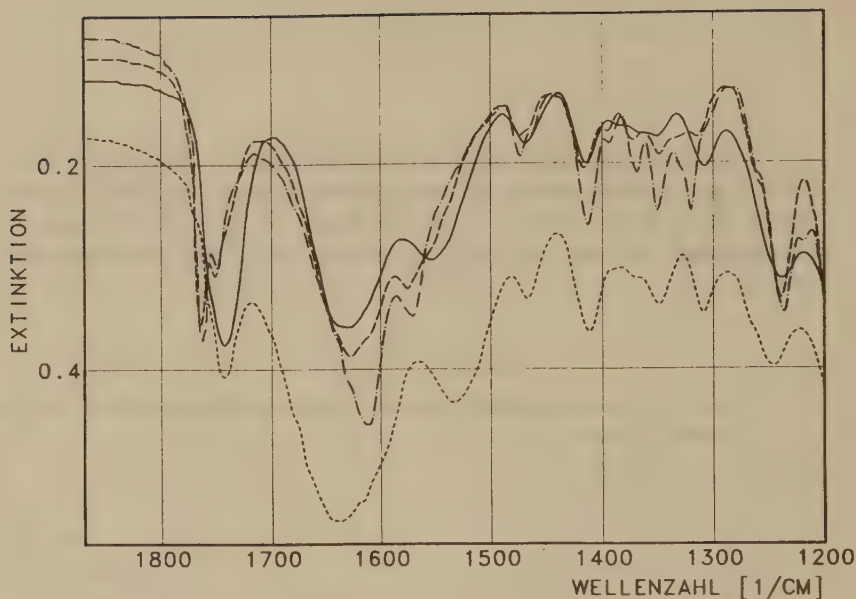


Abb. 38:

PSE + KOH

———— 11% LF, ———— 29% LF, — · — · — 75% LF

----- 85% LF

Im Fall des PSE + KOH Systems findet man bei 11 %LF eine kontinuierliche Absorption im Bereich größerer Wellenzahlen (Abb. 45). Man findet die Bande der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Schwingung bei 1742 cm^{-1} , die $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ Schwingung bei 1415 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingung bei 1218 cm^{-1} und die $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Schwingung bei 920 cm^{-1} . All dies zeigt, daß beide Grenzstrukturen der Brücke $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Gewicht haben und daß die Brücke Protonenpolarisierbarkeit besitzt.

Beim Hydratisieren des Filmes fällt auf, daß bereits bei 29 %LF die $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$ Schwingung bei 1550 cm^{-1} weitgehend verschwunden und dafür $\delta(\text{NH}_2)$ als intensive Bande bei 1572 cm^{-1} zu beobachten ist. Dies zeigt, daß die NH_3^+ Gruppe neutralisiert wird. Bei Hydratationsgraden größer als 75 % wird die

NH_2 -Gruppe von Wasser reprotoniert, wie das Verschwinden der $\delta(\text{NH}_2)$ Bande und das Wiederauftreten der breiten $\delta_s(\text{NH}_3^+)$ Bande bei 1552 cm^{-1} anzeigt.

Ferner taucht beim Übergang von 11 nach 29 %LF eine scharfe $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1763 cm^{-1} auf, die anzeigt, daß eine große Anzahl nicht über Wasserstoffbrücken gebundener Carbonsäuregruppen anwesend ist. Die gebundenen Carbonsäuregruppen verursachen eine schwache Bande bei 1749 cm^{-1} . Hiernach sind die Mehrzahl der intramolekularen $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücken aufgebrochen. Das Verschwinden der intramolekularen Brücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit wird durch eine Abnahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich großer Wellenzahlen angezeigt.

Die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung wird bei 11 %LF bei 970 cm^{-1} beobachtet. Nach Neutralisation der NH_3^+ Gruppen findet man die $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Bande der PSE Moleküle, bei denen die intermolekulare $\text{NH}_3^+\cdots\text{OP}$ Wasserstoffbrücke noch ausgebildet ist, bei 1021 cm^{-1} . Die $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Bande der Moleküle, bei denen die intramolekulare $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke aufgebrochen ist, liegt bei 985 cm^{-1} . Bei einer Luftfeuchtigkeit über 75 % sind die Banden bei 1021 und 985 cm^{-1} wieder verschwunden und die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung erscheint als intensive Bande bei 970 cm^{-1} .

Die Absorption der $\text{O}-\text{P}-\text{O}$ Deformationsschwingung findet man bei 524 cm^{-1} (11 %LF). Eine Aufspaltung bei erhöhter Luftfeuchtigkeit (581 und 534 cm^{-1}) ist bei 85 %LF wieder verschwunden.

Wir haben bereits gesehen, daß bei einer Luftfeuchtigkeit über 75 % die NH_2 Gruppen von Wasser reprotoniert werden. Unter diesen Bedingungen wird die Carbonylbande wieder als relativ intensive Bande bei 1742 cm^{-1} beobachtet, die Bande der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingung liegt bei 1258 cm^{-1} , $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ bei 1414 cm^{-1} und $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ bei 920 cm^{-1} . Die Lage der Carbonylbande zeigt, daß sich die intramolekularen Brücken wieder gebildet haben. Dies wird durch die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung bestätigt, die man wieder bei 970 cm^{-1} findet. Da die Banden beider Grenzstrukturen der an der Wasserstoffbrücke beteiligten Gruppen beträchtliche Intensität haben, hat die intramolekulare Brücke eine nicht unerhebliche Protonenpolarisierbarkeit. In der Tat findet man eine intensive kontinuierliche Absorption. Es läßt sich jedoch nicht unterscheiden, wie weitgehend diese Absorption von der intramolekularen Brücke herrührt. Die hydratisierten (OH^-) Ionen können nämlich eine H_3O_2^- Struktur ausbilden, in der durch

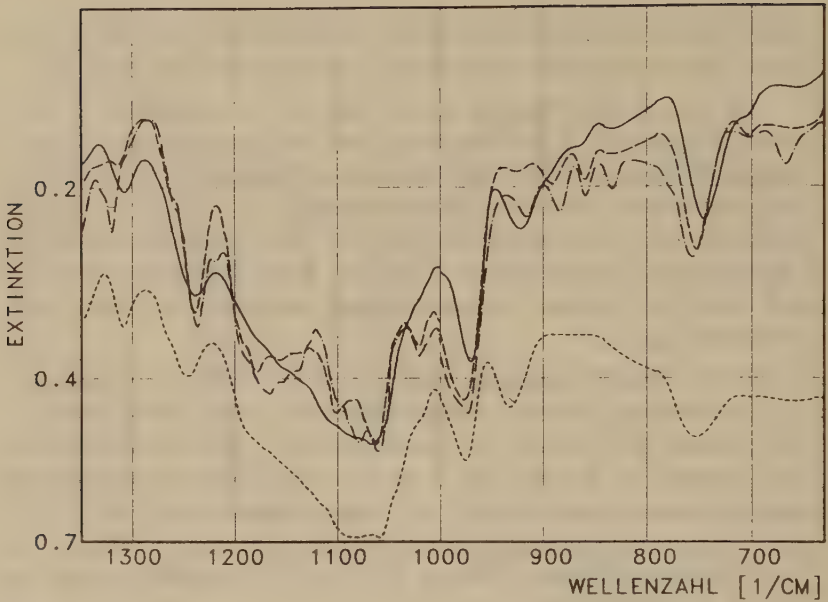


Abb. 39:

PSE + KOH

———11% LF, ———29% LF, - - - - -75% LF
-85% LF

Defektprotonenfluktuation ebenfalls eine intensive kontinuierliche Absorption, beginnend bei 3000 cm^{-1} über den gesamten Meßbereich bis zu kleinen Wellenzahlen, auftreten kann.

3.3.4. PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Im Bereich $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ des Spektrums PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Abb. 40) fällt eine Anhebung des Untergrunds auf, die sich in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Filmes ändert. Diese wird durch eine sich mit der Hydratisierung ändernde Streuung des IR - Strahls am Film verursacht.

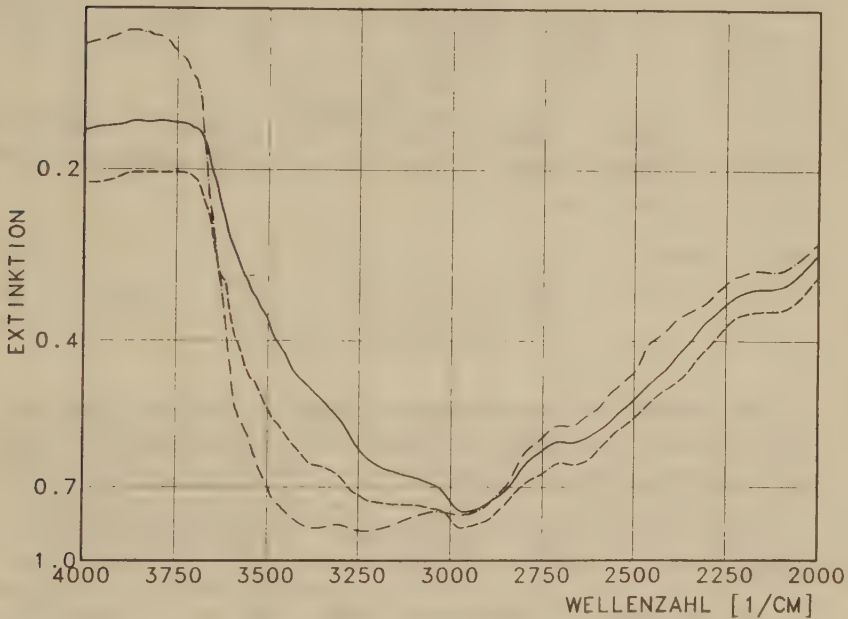


Abb. 40:

PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

— 11% LF, --- 44% LF, - · - 85% LF

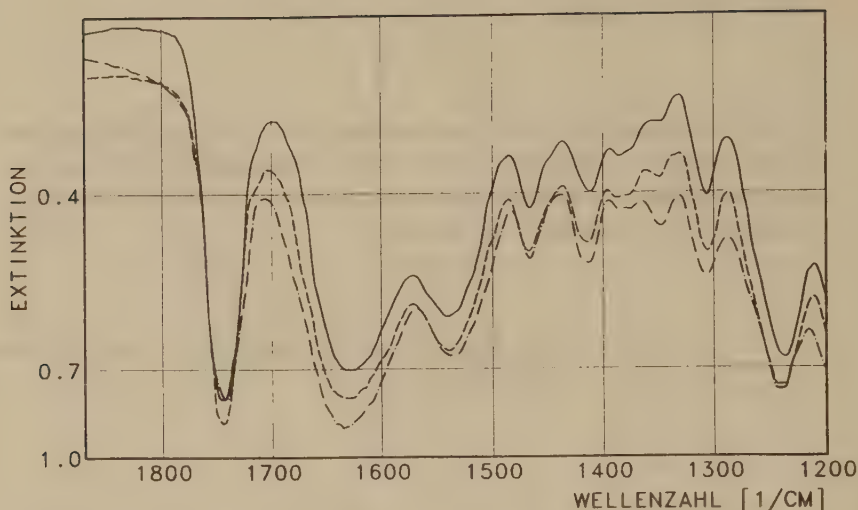


Abb. 41:

PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

— 11% LF, --- 44% LF, - · - 85% LF

Die Bande der Valenzschwingung des Wassers (um 3400 cm^{-1}) zeigt, daß dieses System bei geringer Luftfeuchtigkeit mehr Wasser aufnimmt als das PSE-Zwitterion jedoch weniger als das PSE + KOH System. Im Spektrum der Probe bei 11 %LF findet man eine relativ intensive kontinuierliche Absorption, die sich von 3000 cm^{-1} über den ganzen Bereich nach kleinen Wellenzahlen zu erstreckt.

Die Ausbildung der intramolekularen Brücke zeigt sich im Auftreten der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1745 cm^{-1} , der $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} , der $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1232 cm^{-1} und schließlich der $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande bei 936 cm^{-1} . Im Hinblick auf die Intensität dieser Banden hat die Grenzstruktur (I) ein etwas größeres Gewicht als Grenzstruktur (II). Die intramolekulare (I) $\text{COOH} \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ (II) Brücke hat hiernach eine große Protonenpolarisierbarkeit.

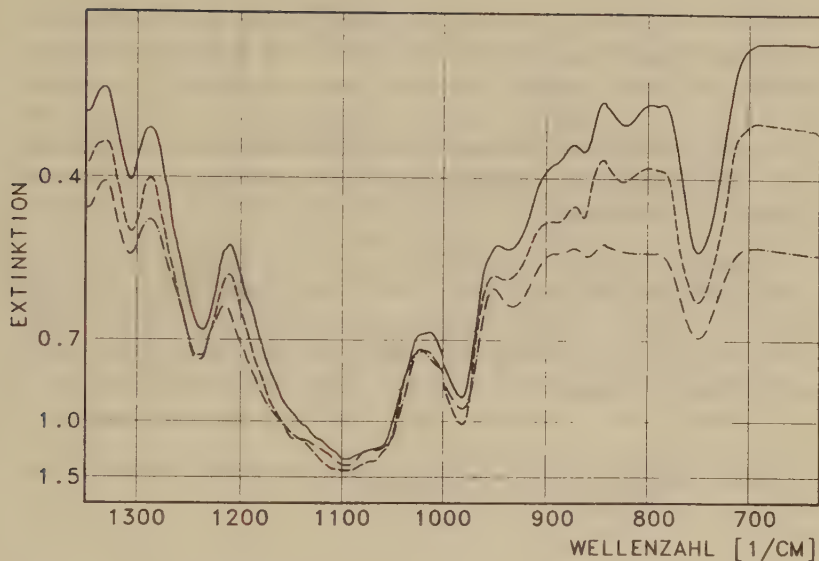


Abb. 42:

PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

———11% LF, -----44% LF, -.-.-.-85% LF

Wie auch bei den anderen Systemen wird die Bande bei 1349 cm^{-1} , die Bande der Carbonsäuregruppe mit mehr $\delta(\text{O}-\text{H})$ -Charakter, mit zunehmender Hydratisierung intensiver.

Der Vergleich der Carbonylbanden im reinen PSE System mit dem im Ca^{2+} System zeigt, daß $\text{Ca}(\text{OH})_2$ weder die intramolekulare Brücke noch die NH_3^+ Gruppen in merklichem Umfang zu neutralisieren vermag.

Mit zunehmendem Hydratationsgrad ändert sich weder die Intensität der Banden der Gruppierungen, die sich an der Bildung der intramolekularen Brücke beteiligen noch findet man eine Änderung der Intensität der $\delta(\text{NH}_3^+)$ Schwingung bei 1542 cm^{-1} . Außerdem wird in diesem System nur die Bande der $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung bei 981 cm^{-1} beobachtet. Alle diese Ergebnisse zeigen, daß $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine zu schwache Base ist, um die Gruppierungen im PSE Zwitterion zu deprotonieren.

Hiernach liegt $\text{Ca}(\text{OH})_2$ hydratisiert vor, wobei die negative Ladung im den Wasserstoffbrücken der Gruppierungen ($\text{OH}^- \cdots \text{OH}_2$) durch die positive Ladung des Ca^{2+} festgehalten wird. Die Defektladung kann aber in der H_3O_2^- Brücke noch fluktuieren, was eine kontinuierliche Absorption über den ganzen Bereich – wie beobachtet – bewirkt.

Aufgrund des zweiwertigen Kations könnte sich eine Struktur, wie sie in Abb. 43 dargestellt ist, ausbilden.

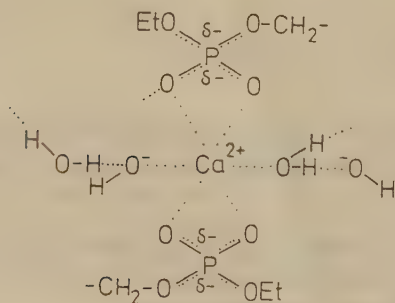


Abb. 43:

Konformation von PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$

3.4. Übersicht über die PSE + Kationen Systeme

Anhand der IR - Spektren wird deutlich, daß das PSE Zwitterion mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nur eine relativ geringe Wasseraufnahme zeigt. Das bedeutet, daß das Zwitterion mit einer negativen Partialladung an der Phosphat bzw. der Carboxylatgruppe und einer positiven an der Aminogruppe eine sehr stabile Struktur ausbilden kann, indem sich energetisch günstige intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden.

Im Gegensatz dazu steht das Verhalten des Systems bei Anwesenheit von Kationen. Bei Zugabe eines Kations (als Hydroxid) ist zu erwarten, daß das PSE - System deprotoniert wird.

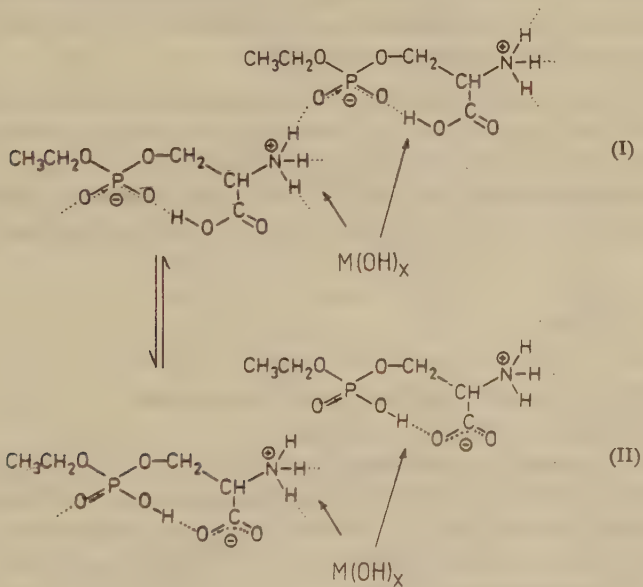


Abb. 44:

Deprotonierung des PSE

bei Zugabe von Kationen $M(OH)_x$

Es bestehen drei Möglichkeiten:

1. Deprotonierung der $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke
2. Deprotonierung der Aminogruppe des Serinrestes
3. Einstellung eines Gleichgewichts zwischen 1 und 2

Aufgrund der pK_a - Werte des in der intramolekularen Brücke anwesenden Protons und der Aminogruppe in wäßriger Lösung wäre zu erwarten, daß das Proton in der Brücke neutralisiert wird.

Bei der Auswertung der Spektren stellt man fest, daß bei geringem Wassergehalt der Filme sowohl die NH_3^+ - Gruppe als auch die $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke deprotoniert werden kann. Erst bei höherer Luftfeuchtigkeit wird das Gleichgewicht verschoben, das Brückenproton wird zunehmend stärker neutralisiert, wie an der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Absorption gut zu erkennen ist, gleichzeitig wird die Aminogruppe wieder teilweise reprotoniert.

Wenn das Hydroxid das PSE nicht vollständig deprotonieren kann, bildet die überschüssige Base $\text{M}(\text{OH})_x$ mit den im Film anwesenden Wassermolekülen H_3O_2^- Strukturen (Lit. 19). Die Wasserstoffbrücke in dieser Gruppe zeigt große Protonenpolarisierbarkeit, sie verursacht daher eine kontinuierliche Absorption, die sich von 3000 cm^{-1} über den ganzen Bereich nach kleinen Wellenzahlen erstreckt.

PSE + LiOH:

Bei 11 %LF ist durch das starke Feld des Li^+ , das sich an der Phosphatgruppe aufhält, das Proton in der intramolekularen



Brücke weitgehend zur Carbonsäuregruppe verschoben, d.h. die Grenzstruktur (II) hat kein merkliches Gewicht. Die Protonenpolarisierbarkeit der Brücke ist klein. Außerdem wird die $\text{NH}_3^+\cdots\text{OH}$ Brücke durch das kräftige Feld des Li^+ , das noch an die OH^- Gruppe gebunden ist, in der Weise polarisiert, daß das Proton an die Aminogruppe gebunden bleibt.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit wird die Wechselwirkung des Lithium mit der Phosphat- sowie der OH^- -Gruppierung durch Wasseranlagerung geschwächt. Damit treten Protonen der NH_3^+ - Gruppen zu OH^- über, d.h. die NH_3^+ Gruppen werden neutralisiert.

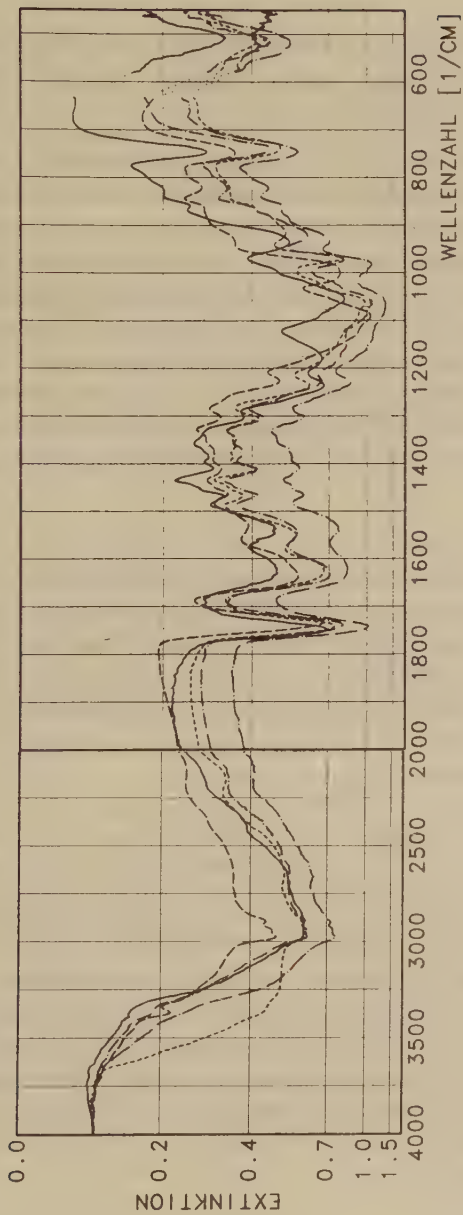


Abb. 45:

PSE + Kationen

— PSE, - - - PSE + LiOH, - · - · - PSE + NaOH

- - - PSE + KOH, — PSE + Ca(OH)₂

(entnommen aus Lit. 19)

Mit weiter zunehmender Luftfeuchtigkeit werden diese Gruppen vom Wasser wieder reprotoniert. Dafür werden Protonen aus der intramolekularen $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke entfernt.

Das System nimmt mit zunehmender Luftfeuchtigkeit deutliche Mengen Wasser auf, die intramolekulare Wasserstoffbrücke ist nur teilweise durch Deprotonierung zerstört. Der starke Einfluß des Kations auf die $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung läßt vermuten, daß sich das Kation in der Nähe der $\text{NH}_3^+\cdots\text{OP}$ Brücke aufhält, wie in Abb. 33 dargestellt. Während im trockenen Film LiOH noch als Ionenpaar vorliegt, wird durch Wassieranlagerung Li^+ gelockert und das verbleibende OH^- kann die benachbarte NH_3^+ Gruppierung weitgehend neutralisieren. Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit wird unter weiterer Wasseraufnahme des Filmes die Aminogruppe wieder reprotoniert. Auch die intramolekulare $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke wird teilweise durch Deprotonierung zerstört.

PSE + NaOH:

Bei 11 %LF findet man eine ähnlich starke Wasseraufnahme des Systems wie bei Anwesenheit von Li^+ . Eine kontinuierliche Absorption im Bereich $3000 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ist zu erkennen, was darauf hinweist, daß die intramolekulare $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke eine große Protonenpolarisierbarkeit besitzt. Die $\text{COO}^-\cdots\text{HOP}$ Grenzstruktur besitzt ein größeres Gewicht als im vergleichbaren Lithium-System. Dies wird durch die Intensität der Banden der an den Grenzstrukturen beteiligten Gruppierungen bestätigt.

Die kontinuierliche Absorption, betrachtet bei 1900 cm^{-1} , ist etwas stärker ausgeprägt als beim Li^+ -System. Dies läßt sich mit einer höheren Protonenfluktuation, bedingt durch eine geringere Verschiebung des Gleichgewichts in der intramolekularen $\text{COOH}\cdots\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^-\cdots\text{HOP}$ Brücke, erklären (Abb. 45).

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit wird die Carbonsäuregruppe geringfügig deprotoniert. Anders als im Lithium-System beobachtet man nur eine geringfügige Deprotonierung der NH_3^+ Gruppe, die anwesendem OH^- Moleküle bilden mit Wasser H_3O_2^- Strukturen. Dies äußert sich in einer kontinuierlichen Absorption, die sich auch nach kleineren Wellenzahlen erstreckt, hervorgerufen durch die große Protonenpolarisierbarkeit der H_3O_2^- Gruppierung.

PSE + KOH:

Im Vergleich zum Lithium- und Natrium-System zeigt der Film mit KOH bereits bei 11 %LF einen deutlich höheren Wassergehalt. Man findet eine kontinuierliche Absorption im Bereich größerer Wellenzahlen, die durch Protonenfluktuation in der intramolekularen Wasserstoffbrücke hervorgerufen wird. Aus der Intensität der Banden geht hervor, daß das Proton dabei eine weitgehend größere Aufenthaltswahrscheinlichkeit an der Carbonsäuregruppe hat.

Beim Hydratisieren des Filmes fällt auf, daß die NH_3^+ Gruppe des PSE bei 29 %LF bereits nahezu vollständig deprotoniert ist. Anhand der Aufspaltung der Carbonylbanden ist festzustellen, daß die intramolekulare Brücke zu einem großen Teil aufgebrochen ist. Es fällt auf, daß trotz des Aufbrechens der $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Brücke die Carbonsäuregruppe nicht weiter deprotoniert wird. Einhergehend mit dem Aufbrechen dieser Brücke beobachtet man eine Abnahme der kontinuierlichen Absorption.

Wird die Luftfeuchtigkeit über dem Film weiter erhöht, verschwindet die Aufspaltung der Carbonylbande wieder, was bedeutet, daß die intramolekulare Brücke nun wieder vollständig gebildet wird. Die Aminogruppe wird vermutlich durch Wassermoleküle wieder reprotoniert. Man beobachtet eine starke Zunahme der kontinuierlichen Absorption, die von den wieder gebildeten intramolekularen Brücken herrührt. Zum Teil ist die kontinuierliche Absorption auch von H_3O_2^- Gruppierungen verursacht.

PSE + $\text{Ca}(\text{OH})_2$:

Mit steigender Luftfeuchtigkeit beobachtet man eine vergleichsweise geringe Wasseraufnahme des Filmes. Das Gleichgewicht der intramolekularen Brücke bleibt unverändert. Ebenso zeigt die unveränderte $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung, daß die NH_3^+ Gruppe nicht deprotoniert wird und das Gleichgewicht der intermolekularen Brücke mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nicht verschoben und die Brücke nicht aufgebrochen wird. Die geringen Bandenveränderungen mit zunehmender Hydratation belegen, daß bei Anwesenheit von Ca^{2+} eine sehr stabile Struktur gebildet ist.

Festzustellen ist eine sehr geringe Zunahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich kleinerer Wellenzahlen, die wohl durch die hohe Protonenpolarisierbarkeit der Wasserstoffbrücken in den H_3O_2^- Gruppierungen hervorgerufen ist.

3.5. Konformation von Polyaminosäuren

Die überwiegend auftretenden Konformationen sind α -Helix, antiparalleles Faltblatt und Knäuelstruktur. Diese lassen sich durch unterschiedliche Absorptionen im IR gut unterscheiden.

	Amid A	Amid I	Amid II
α - Helix	3300 - 3280	1660 - 1650	1550 - 1540
β - Faltblatt	3280 - 3250	1690/1630	1530 - 1520
Knäuel	um 3200	um 1655	1550 - 1520

Tabelle 4:

Absorptionen von Polyaminosäuren in cm^{-1}

(Lit. 81 - 86)

Sekundärstruktur von Poly - L - Histidin

Poly - L - Histidin kann in Filmen in zwei Konformationen vorliegen: In unprotoniertem Zustand findet man α - Helix Konformation, die protonierte Polyamino­säure liegt als Knäuel vor. Beim Hydratisieren zeigt sich keine Veränderung.

Sekundärstruktur von Poly - L - Lysin

Aus früheren Untersuchungen von Poly - L - Lysin Filmen ist bekannt (Lit.78), daß die unprotonierte Polyamino­säure in rechtsdrehender α - Helix Struktur vorliegt. Beim Hydratisieren dieser Filme wurde keine Konformationsänderung beobachtet.

Filme aus protoniertem Poly - L - Lysin findet man in getrocknetem Zustand ebenfalls in α - Helix Konformation, diese wandelt sich mit zunehmendem Wassergehalt nahezu quantitativ in antiparallele β - Faltblattstruktur um. Dies wirkt sich in folgender Weise auf die IR - Absorptionen aus: Die Amid A Bande ist nahezu unverändert bei 3290 cm^{-1} zu finden. Dagegen beobachtet man eine Veränderung der Amid I Absorption, die Bande bei 1656 cm^{-1} verschwindet, gleichzeitig erscheint eine Absorption bei 1629 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1690 cm^{-1} , charakteristisch für die antiparallele β - Faltblatt Konformation. Die Amid II Absorption zeigt praktisch keine Veränderung.

3.6.1. Poly-L-Histidin + PSE

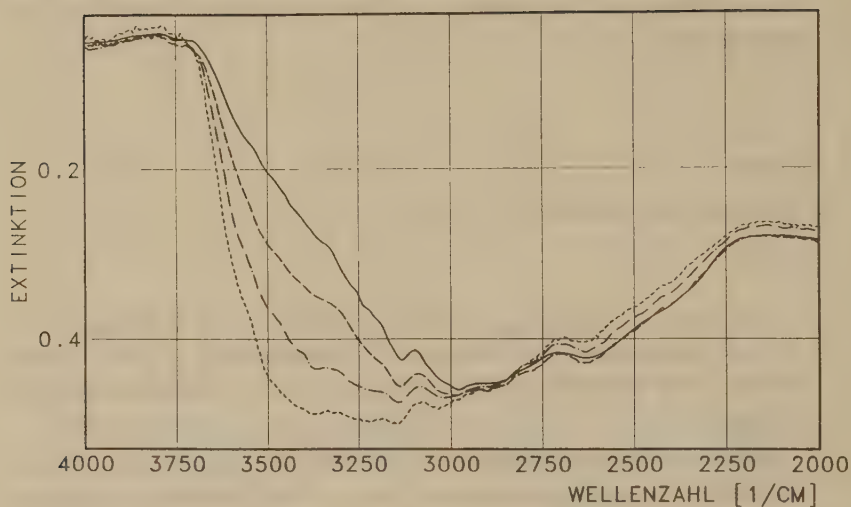


Abb. 46:

$(\text{His})_n + \text{PSE}$

——— 0% LF, ---- 29% LF, -.-.- 57% LF

..... 75% LF

Im Bereich $4000 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ zeigt das System $(\text{His})_n + \text{PSE}$ eine deutliche Wasseraufnahme (Bande bei 3400 cm^{-1}). Um 3250 cm^{-1} beobachtet man die sehr breite Amid A Bande und bei 3135 cm^{-1} die Amid B Bande der Polyamino-säure. Hiernach liegt in diesem System $(\text{His})_n$ als Knäuel vor.

Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Absorption des PSE bei 1747 cm^{-1} verliert mit zunehmender Hydratisierung etwas an Intensität. Die Absorption bei 1659 cm^{-1} setzt sich aus der Amid I Schwingung des Histidin, der $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Schwingung des PSE und der Deformationsschwingung der Wassermoleküle zusammen. Eine bei 1627 cm^{-1} auftretende Absorption ist der R_1 -Schwingung des protonierten Imidazolringes von Histidin zuzuordnen. Amid II und $\delta_{\text{s}}(\text{NH}_3^+)$ des PSF geben zu einer Absorption bei 1538 cm^{-1} Anlaß.

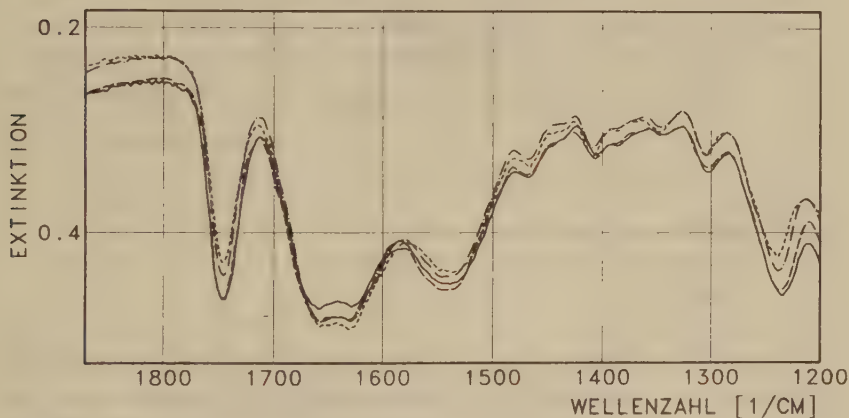


Abb. 47:

$(\text{His})_n + \text{PSE}$

——— 0% LF, ---- 29% LF, -·-·- 57% LF

····· 75% LF

Im Bereich der Phosphatbanden beobachtet man eine Verschiebung der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande unter geringfügigem Intensitätsverlust von 1235 nach 1242 cm^{-1} . Da diese Veränderungen mit denen der Carbonylbande bei 1747 cm^{-1} einhergehen, kann gesagt werden, daß mit zunehmender Hydratisierung die intramolekulare $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ Wasserstoffbrücke des PSE durch Deprotonierung zerstört wird (Abb. 58).

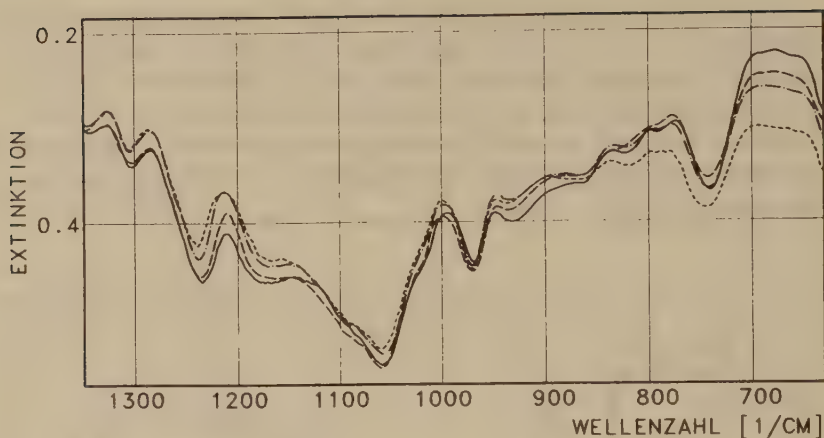


Abb. 48:

$(\text{His})_n + \text{PSE}$

——— 0% LF, ---- 29% LF, -.-.- 57% LF
 75% LF

Im $(\text{His})_n + \text{PSE}$ System liegt die Polyaminosäure von Anfang an weitgehend protoniert vor, erkenntlich an der Knäuelstruktur des Rückgrates und der intensiven R_1 -Ringschwingung des protonierten Imidazolringes. Das Proton stammt nur zu einem sehr geringen Anteil von der Aminogruppe des PSE, da die $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Absorption nur als sehr schwache Schulter bei 1020 cm^{-1} zu erkennen ist.

Hiernach wird die intramolekulare Brücke aufgebrochen und es bilden sich Carbonsäure-Histidin Brücken. Die Carbonsäurebande bei 1747 cm^{-1} und die Bande der R_1 Ringschwingung des $(\text{His})_n$ zeigen, daß beide Protonengrenzstrukturen der $\text{COOH} \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücke großes Gewicht haben.

Es ist eine kontinuierliche Absorption zu beobachten, die sich über den gesamten Bereich des Spektrums ausdehnt. Daraus ist zu schließen, daß obige Wasserstoffbrücken große Protonenpolarisierbarkeit besitzen, wie nach Lit. 74 zu erwarten ist. Die geringfügige Abnahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$ -Bande zeigt, daß mit zunehmender Hydratisierung eine Verschiebung des Gleichgewichts in der PSE-Histidin Wasserstoffbrücke zugunsten der protonierten Histidin-Struktur erfolgt. Durch diese Verschiebung des Gleichgewichts nimmt die Intensität der kontinuierlichen Absorption bei erhöhter Luftfeuchtigkeit geringfügig ab.

3.6.2. Poly-L-Histidin + PSE + LiOH:

Anders als im System $(\text{His})_n + \text{PSE}$ liegt die Polyamino-säure bei Anwesenheit von Kationen in α -Helix Struktur vor. Die Amid A Bande liegt bei 3182 cm^{-1} (nicht abgebildet), Amid I bei 1650 cm^{-1} und Amid II bei 1550 cm^{-1} .

Die Carbonylabsorption (1747 cm^{-1} bei $(\text{His})_n + \text{PSE}$) ist deutlich zu kleineren Wellenzahlen verschoben, sie liegt bei 1732 cm^{-1} und verliert mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nur relativ wenig an Intensität. Da die R_1 Ringschwingung bei 1628 cm^{-1} (protonierter Imidazolring) vollständig fehlt, liegt Histidin unprotoniert vor.

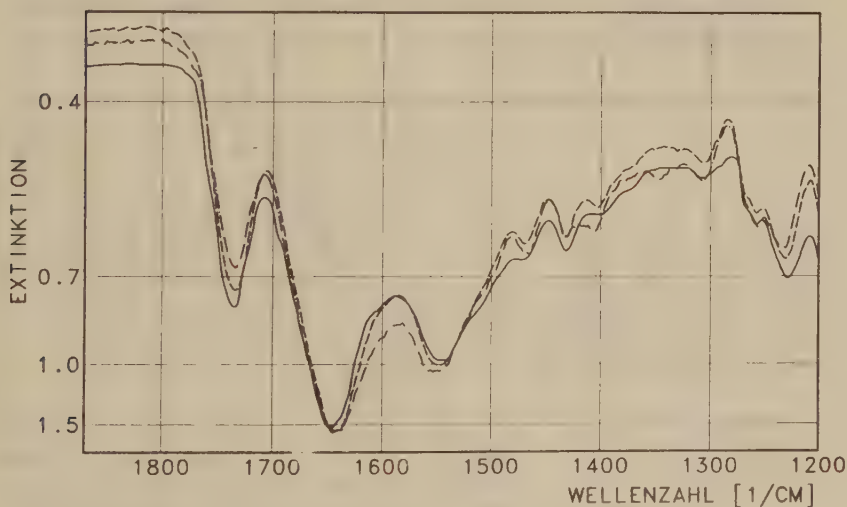


Abb. 49:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

— 0% LF, - - - 29% LF, - · - 75% LF

Die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Absorption des PSE bei 1250 cm^{-1} ist den $\delta(\text{C}-\text{H})$ Schwingungen des Histidin-Imidazolrings bei 1259 und 1231 cm^{-1} überlagert. Eine Verschiebung der Bande bei 1228 cm^{-1} (0 % LF) unter Intensitätsabnahme nach 1233 cm^{-1} (75 % LF) kann festgestellt werden. Dies zeigt, daß die kräftigen $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücken aufgebrochen werden. An die Phosphatgruppe sind bei großer Luftfeuchtigkeit Wassermoleküle über schwache Wasserstoffbrücken gebunden.

Interessant ist die $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingung des PSE. Wie schon bei $\text{PSE} + \text{Li}^+$ beobachtet, tritt auch hier ein Bandenpaar bei 1015 und 982 cm^{-1} auf. Die Veränderungen dieser Banden während des Hydratisierens sind vergleichbar. Die Bande bei 1015 cm^{-1} ($\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$) gewinnt von 0-75 % LF an Intensität. Hiernach werden mit zunehmendem Hydratationsgrad Aminogruppen des PSE deprotoniert. Besonders bemerkenswert ist, daß das LiOH in diesem System nicht das Brückenproton, sondern das Proton der Aminogruppe des PSE neutralisiert.

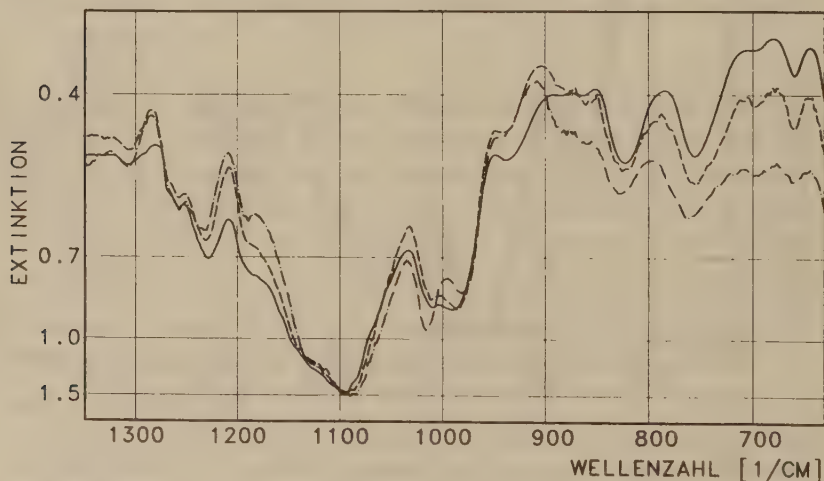


Abb. 50:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

— 0% LF, - - - 29% LF, - · - · - 75% LF

3.6.3. Poly-L-Histidin + PSE + NaOH:

Wasseraufnahme und α -Helix Struktur sind mit dem Li^+ -System vergleichbar. Die Intensitätsabnahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande des PSE bei 1740 cm^{-1} macht allerdings deutlich, daß mit zunehmender Wasseraufnahme die intramolekulare Wasserstoffbrücke $\text{COOH}\cdots\text{OP}$ durch Deprotonierung teilweise zerstört wird.

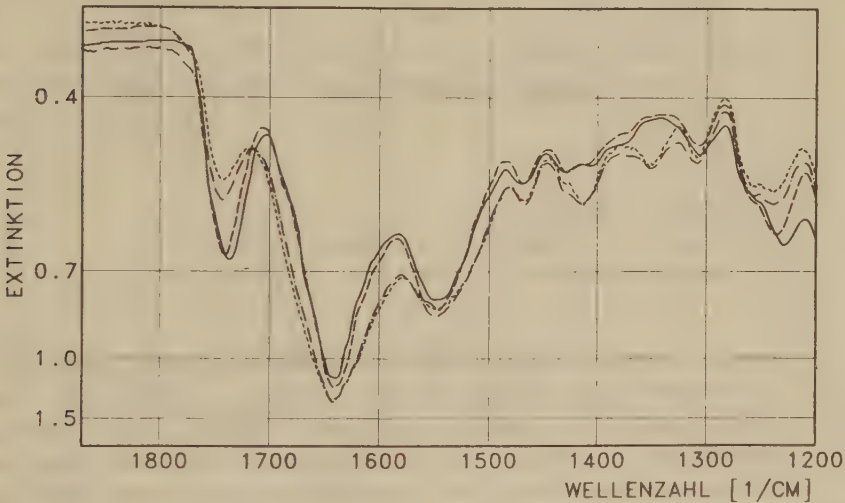


Abb. 51:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$

———— 0% LF, ----- 29% LF, ····· 57% LF
······ 75% LF

Da die Banden bei 1641 und 1549 cm^{-1} im Amid I und Amid II Bereich durch Überlagerung mehrerer Schwingungen hervorgerufen werden, lassen sich hieraus wenig Erkenntnisse gewinnen. Die bei 1628 cm^{-1} zu erwartende

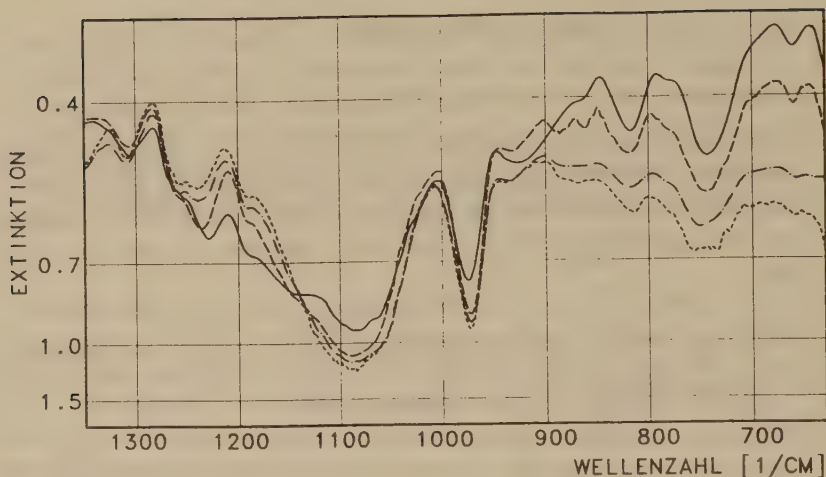


Abb. 52:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$

———— 0% LF, ----- 29% LF, - · - · - 57% LF

····· 75% LF

Imidazol-Ringschwingung des protonierten Histidin ist in diesen Spektren nicht zu beobachten, die Polyamino-säure liegt demnach unprotoniert vor. Die Intensitätszunahme der Bande bei 1412 cm^{-1} ($\nu_s(\text{CO}_2^-)$) mit steigender Luftfeuchtigkeit zeigt ebenso wie die bereits diskutierte Carbonylschwingung, daß intramolekulare PSE-Brücken durch Deprotonierung zerstört werden. Hierbei ist der Grad der Neutralisation größer als im System ohne Polyamino-säure.

Die $\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ Bande im Bereich $1250-1220 \text{ cm}^{-1}$ nimmt mit zunehmendem Hydratationsgrad ab, stärker ist auch die Abnahme der Schulter bei 1190 cm^{-1} der $\nu_{as}(\text{RO-P-OEt})$ Bande. Die Intensitätszunahme der $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ Absorption bei 1084 cm^{-1} mit zunehmendem Wassergehalt des Filmes scheint ein Na^+ spezifischer Effekt zu sein, denn dies wurde auch beim $\text{PSE} + \text{Na}^+$ System (Kap. 3.3.2) beobachtet. Während die $\nu(\text{C-N})$ Schwingung bei 973 cm^{-1} etwas an Intensität zunimmt wird die $\nu(\text{P-(OH)})$ Bande bei 926 cm^{-1} (0 %LF) schwächer und verschiebt sich nach 932 cm^{-1} (75 %LF). Dies besagt, daß bei kleinen Luftfeuchtigkeiten einige NH_3^+ Gruppen deprotoniert sind. Diese werden mit zunehmender Hydratation reprotoniert.

3.6.4. Poly-L-Histidin + PSE + KOH:

Bei Filmen mit K^+ war es generell schwierig, gute Filme zu erzeugen. Hier gelang es nur, Spektren der Substanz bei 29 und 44 %LF aufzunehmen, weil bei höheren Luftfeuchtigkeiten der Film nicht mehr auf dem Probenträger haftete. Man beobachtet eine Aufspaltung der $\nu(C=O)$ Bande in zwei Komponenten bei 1759 und 1746 cm^{-1} . Hierbei bleibt jedoch die Bande bei 1746 cm^{-1} weit intensiver, d.h. bei Anwesenheit von Histidin brechen weit weniger intramolekulare Brücken auf als im System ohne $(\text{His})_n$.

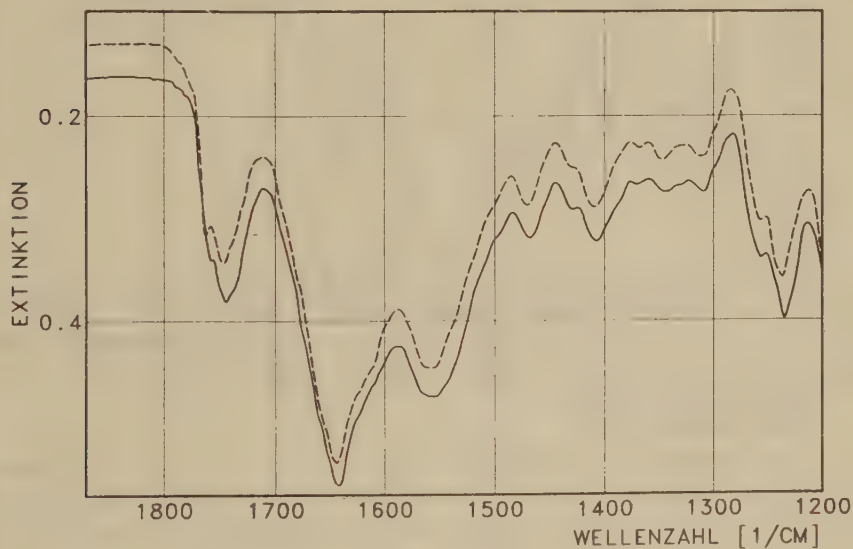


Abb. 53:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$

———29% LF, ----44% LF

Die Absorption bei 1646 cm^{-1} ist von der Amid I sowie der $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Schwingung hervorgerufen, eine schwache Schulter bei 1628 cm^{-1} könnte von der R_1 -Ringschwingung einiger protonierter Histidinreste stammen. Unter der Amid II Absorption bei 1559 cm^{-1} verbirgt sich auch noch die $\delta_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ Schwingung des PSE.

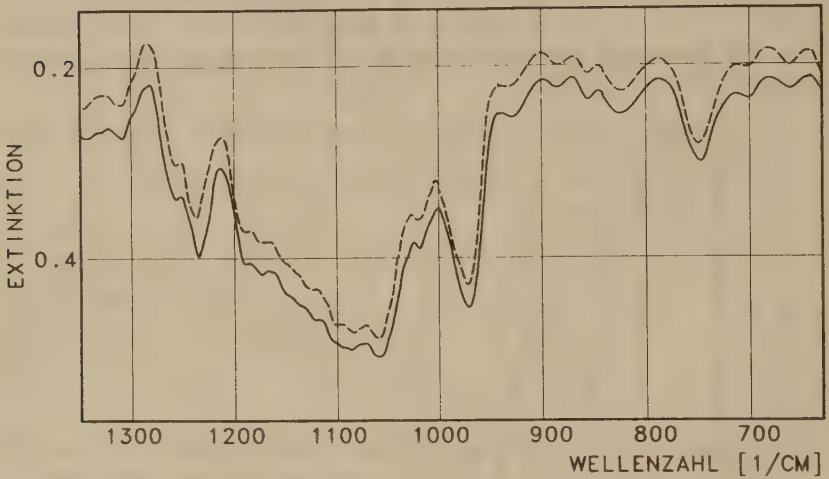


Abb. 54:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$

————— 29% LF, ———— 44% LF

Die für das Kaliumion typischen Bandenaufspaltungen findet man auch im Bereich der Phosphatbanden. Wegen der Überlagerung mit Absorptionen des Histidin ist eine Zuordnung schwierig. Die Bande bei 931 cm^{-1} kann der $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Schwingung zugeordnet werden. Die Banden bei 1020 und 971 cm^{-1} werden von $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ bzw. $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingungen hervorgerufen. Hiernach wird eine geringfügige Anzahl der Aminogruppen des PSE deprotoniert.

3.6.5. Poly-L-Histidin + PSE + Ca(OH)₂

Die Veränderungen in Abhängigkeit vom Grad der Hydratisierung sind im System (His)_n + PSE + Ca²⁺ gering. Aus der Amid A Bande bei 3276 cm⁻¹ ist ersichtlich, daß Histidin in einer geordneten Struktur vorliegt. Die Amid I Bande zeigt, daß es sich bei dieser Struktur um eine α -Helix handelt.

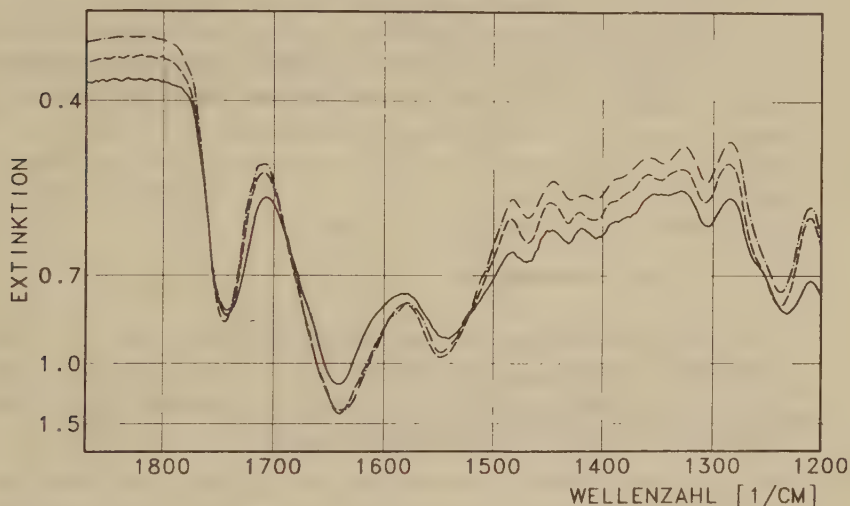


Abb. 55:

(His)_n + PSE + Ca(OH)₂

— 0% LF, --- 57% LF, - · - 75% LF

Ebenso wie in den PSE + Ca²⁺ Filmen ohne (His)_n zeigt sich die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Absorption bei 1742 cm⁻¹ mit vergleichbar großer Intensität, mit steigender Luftfeuchtigkeit sind an ihr keine Veränderungen zu beobachten. Die fehlende Absorption bei 1628 cm⁻¹ belegt, daß Histidin in unprotoniertem Zustand vorliegt.

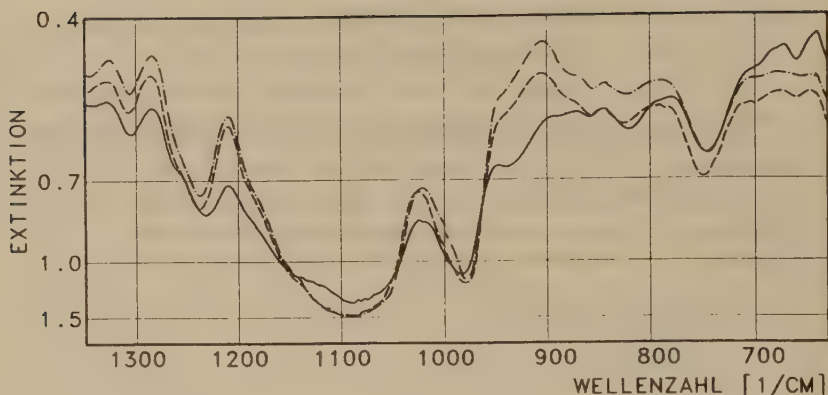


Abb. 56:



——— 0% LF, ——— 57% LF, - · - · - 75% LF

Im Bereich der Phosphatbanden fällt auf, daß $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ bei 936 cm^{-1} mit zunehmender Hydratisierung an Intensität verliert. Dies zeigt, daß mit zunehmender Hydratisierung das Gleichgewicht der intramolekularen Brücke etwas zugunsten der $\text{COOH} \cdots \text{OP}$ Struktur verschoben wird.

Alle diese Befunde zeigen zusammengefaßt, daß die OH^- Ionen weder das Amino- noch das Brückenproton neutralisieren können. Dies wird verständlich, wenn man annimmt, daß das OH^- Ion über eine $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OH}$ Brücke an die Aminogruppe jedoch zusätzlich an das Ca^{2+} gebunden ist. Durch das starke Feld des Ca^{2+} Ions kann das Proton der Aminogruppe nicht zu OH^- übertreten. Die intensive kontinuierliche Absorption (Abb. 58) ist hiernach neben den noch anwesenden intramolekularen Brücken durch die struktursymmetrische Brücke in H_3O_2^- verursacht.

3.7. Übersicht über die Poly - L - Histidin Systeme

$(\text{His})_n + \text{PSE}$

Bei Betrachtung der $(\text{His})_n + \text{PSE}$ Spektren fällt auf, daß Histidin teilweise protoniert vorliegt. $(\text{His})_n$ liegt als Knäuel vor. Man beobachtet das Auftreten einer relativ intensiven kontinuierlichen Absorption, die sich auch in den Bereich kleiner Wellenzahlen erstreckt (Abb. 57). Dies läßt darauf schließen, daß sich zwischen der Carbonsäuregruppe des PSE und dem Histidinrest Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit ausbilden.

Eine Histidin - Phosphat Brücke würde wegen der großen pK_a Differenz zwischen protoniertem Histidin und Phosphat ein stark unsymmetrisches Protonenpotential aufweisen und damit bestenfalls eine kontinuierliche Absorption im Bereich höherer Wellenzahlen erzeugen.

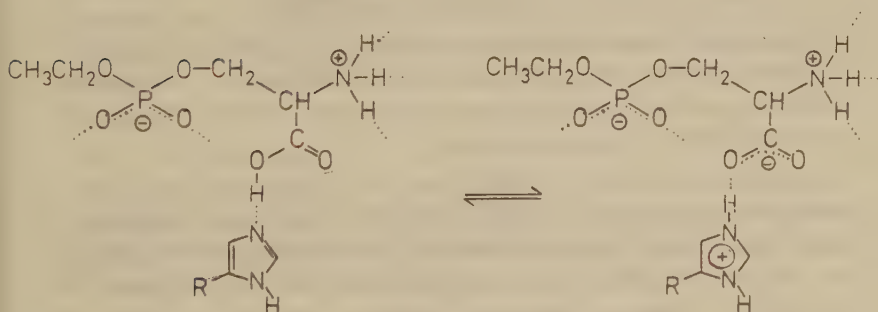


Abb. 57:

Konformation des $(\text{His})_n + \text{PSE}$ Systems

Mit zunehmender Hydratisierung nimmt die Intensität der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande geringfügig ab, was bedeutet, daß das Protontransfer-Gleichgewicht der Carbonsäure-Histidin Brücke ein wenig weiter zugunsten einer Struktur mit protoniertem Histidin (II) verschoben wird. Die ν_{as} - und $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ Schwingungen sind in diesem Zusammenhang nicht auswertbar. Sie werden von der H_2O -Deformations- bzw. der R_3 -Imidazol Ringschwingung (Histidin) überlagert.

Eine Verschiebung der Bande bei 1235 cm^{-1} (0 %LF) unter Intensitätsabnahme nach 1242 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$) ist dadurch verursacht, daß starke Wasserstoffbrücken zwischen der Amino- und der Phosphatgruppe aufgebrochen und Wassermoleküle über schwache Brücken an die Phosphatgruppe angelagert werden.

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$:

$(\text{His})_n$ liegt in α -Helix Struktur vor. Aus dem Fehlen der R_1 -Ringschwingung bei 1628 cm^{-1} geht hervor, daß Histidin unprotoniert ist.

Mit steigender Luftfeuchtigkeit beobachtet man eine im Vergleich zum $\text{PSE} + \text{LiOH}$ System geringere Wasseraufnahme (Bande bei 3400 cm^{-1}), durch Zugabe von Histidin wird somit das gesamte System hydrophober, ein Effekt, der auch bei den anderen Histidin-Filmen feststellbar ist.

Die Bande der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Schwingung nimmt mit zunehmendem Hydratationsgrad merklich ab, d.h. die intramolekulare Brücke wird durch Neutralisation zerstört. Darüberhinaus findet man bereits bei 11 %LF die $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Bande. Diese nimmt mit zunehmendem Hydratationsgrad stark zu, während die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung beträchtlich abnimmt. Dies bedeutet, daß die Aminogruppe des PSE zunehmend neutralisiert wird. Offensichtlich wird durch die Bildung der intramolekularen Wasserstoffbrücke die Aminogruppe bevorzugt vor dem in der Brücke anwesenden Proton neutralisiert.

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$:

Das $(\text{His})_n$ System liegt auch in diesem Fall als α -Helix vor. Auch in diesem System gehen keine Protonen zum $(\text{His})_n$ über. Im Gegensatz zum Lithium-System nimmt mit zunehmender Hydratisierung die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1740 cm^{-1} stark ab. Simultan erscheint $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ bei 1412 cm^{-1} . Beides zeigt, daß durch Neutralisation intramolekulare Brücken zerstört werden. Andererseits beobachtet man keine $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung um 1020 cm^{-1} , d.h. die Aminogruppen werden im Gegensatz zu den Verhältnissen im Lithium-System nicht neutralisiert.

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$:

Die Polyamino-säure liegt auch hier in α -Helix Konformation vor. Eine schwache $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1759 cm^{-1} rührt von Carbonsäuregruppen her, die nicht über Wasserstoffbrücken gebunden sind, d.h. in diesem System sind einige intramolekulare Wasserstoffbrücken aufgebrochen. Der Effekt ist jedoch weit schwächer als im entsprechenden System ohne $(\text{His})_n$. Die Anwesenheit einer schwachen $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung zeigt, daß einige Aminogruppen deprotoniert werden.

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{Ca}(\text{OH})_2$:

$(\text{His})_n$ liegt in diesem Film in α -Struktur vor. Auch mit zunehmendem Hydratationsgrad vermag das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ weder das Proton in der intramolekularen Brücke noch das Proton der NH_3^+ Gruppe des PSE zu neutralisieren.

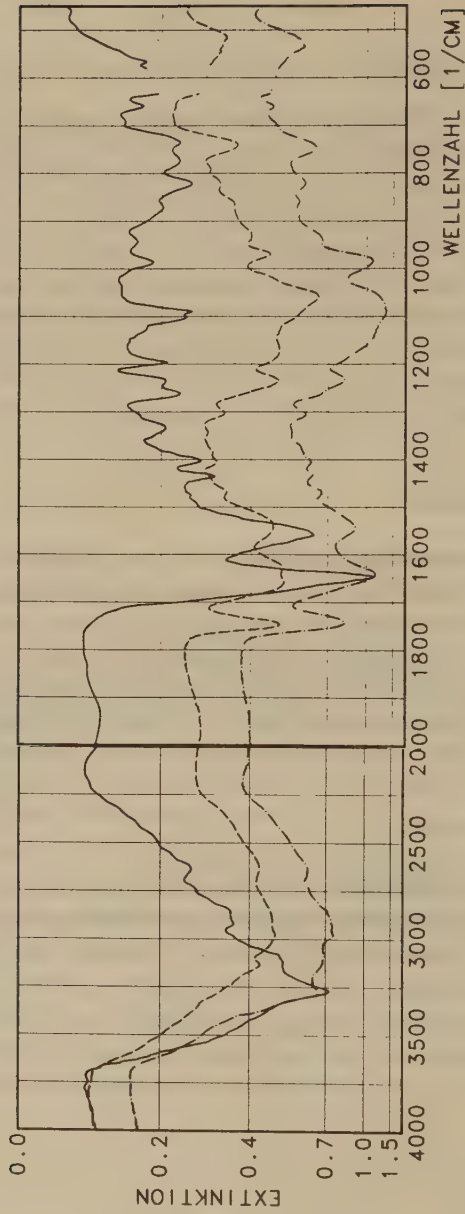


Abb. 58:

$(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{Kationen}$

— $(\text{His})_n$, --- $(\text{His})_n + \text{PSE}$, - · - · - $(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{Ca(OH)}_2$

3.8.1. Poly-L-Lysin + PSE

Poly-L-Lysin ist eine stark basische Polyamino­säure, der pK_a Wert der Seitengruppe beträgt 10,44. Von allen untersuchten Systemen ist deshalb hier die stärkste Wechselwirkung mit PSE zu erwarten. Die Amid A Bande der Polyamino­säure liegt bei 3276 cm^{-1} , und aus der Lage der Amid I und Amid II Absorptionen (siehe unten) ist zu schließen, daß Lysin in α -Helix Konformation vorliegt. Diese bleibt auch beim Hydratisieren des Filmes erhalten.

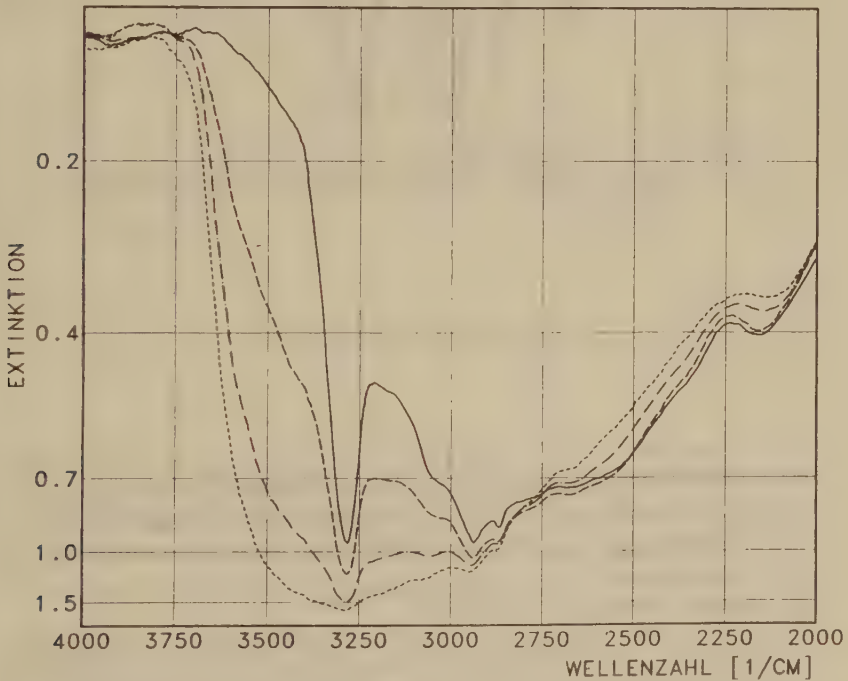


Abb. 59:

(Lys)_n + PSE

— 0% LF, --- 29% LF, - · - · 57% LF
····· 85% LF

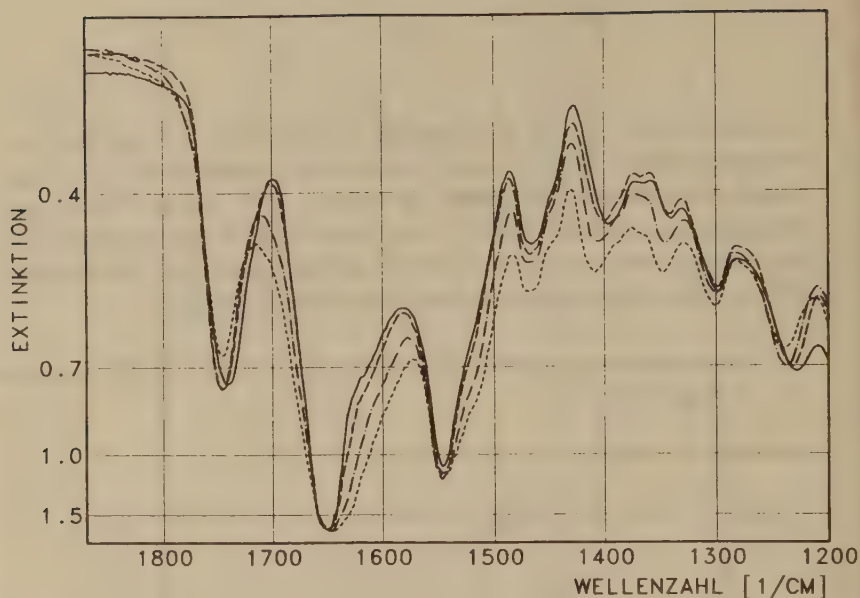


Abb. 60:

(Lys)_n + PSE

———— 0% LF, ----- 29% LF, ······ 57% LF

········ 85% LF

Bei 0 %LF findet man $\nu(\text{C}=\text{O})$ bei 1742 cm^{-1} , $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ bei 1397 cm^{-1} , $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ bei 1228 cm^{-1} und $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ bei 934 cm^{-1} . Im Hinblick auf die relativ kräftigen $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ und $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Banden hat die Grenzstruktur (II) in der intramolekularen



Die $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande liegt bei relativ niedrigen Wellenzahlen. Dies zeigt, daß eine recht kräftige intermolekulare $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OC}$ Wasserstoffbrücke gebildet ist. Da beide Protonengrenzstrukturen ein beträchtliches Gewicht haben, ist ihre Protonenpolarisierbarkeit relativ groß. Die Brücke trägt damit zumindest im Bereich $3000 - 1600\text{ cm}^{-1}$ zu der beobachteten kontinuierlichen Absorption (Abb. 74) bei.

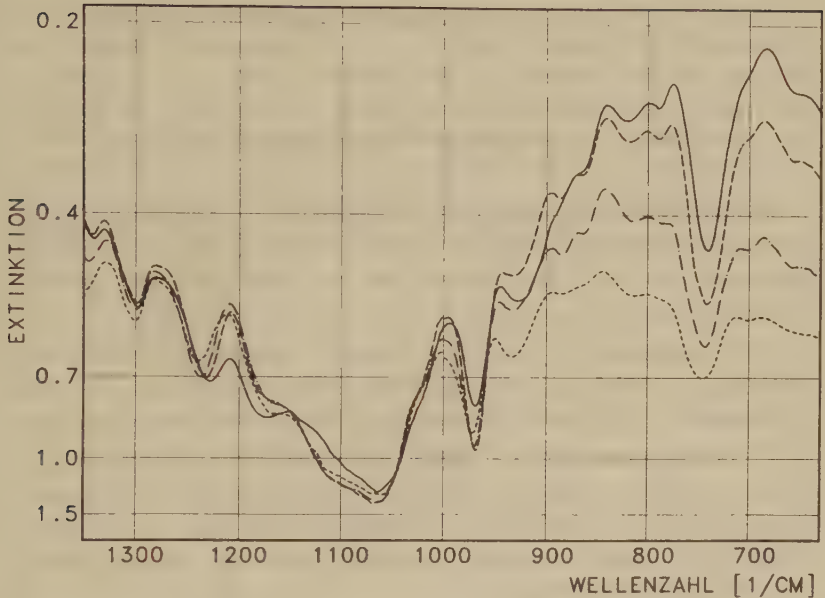


Abb. 61:

(Lys)_n + PSE

— 0% LF, ---- 29% LF, -.-.- 57% LF
..... 85% LF

Es stellt sich die Frage, woher die Protonen stammen, die die NH_2 Gruppe des $(\text{Lys})_n$ protonieren. Der Vergleich der Intensität der Carbonylbande bei 1742 cm^{-1} mit der entsprechenden Bande im System ohne $(\text{Lys})_n$ (Abb. 20) zeigt, daß die Intensität der Bande bei Anwesenheit von Lysin geringer ist. Demnach sind einige intramolekulare Brücken durch Deprotonierung zerstört.

Da die $\nu(\text{C}-\text{N})$ Absorption des Lysin bei höheren Wellenzahlen (etwa im Bereich um 1100 cm^{-1}) zu erwarten ist, sind die zwei im Film vorhandenen Aminogruppen (von Lysin bzw. PSE) gut zu unterscheiden. Man findet man bei 1020 cm^{-1} eine schwache Schulter, die der $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung zuzuordnen ist.

$(\text{Lys})_n$ + PSE zeigt eine starke Zunahme der Wasserbande (3400cm^{-1}) mit zunehmender Luftfeuchtigkeit. Unter den $\nu(\text{C}-\text{H})$ Schwingungen beobachtet man eine breite intensive Absorption bei $3000-2700\text{cm}^{-1}$. Sie ist von den $\nu(\text{NH}_3^+)$ Schwingungen des Lysin verursacht. Die Bande bei 2145cm^{-1} ist für Lysin NH_3^+ Gruppen, die starke Wasserstoffbrücken ausbilden, charakteristisch.

Hiermit können sich einige $\text{NH}^+\cdots\text{N}\rightleftharpoons\text{N}\cdots\text{H}^+\text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit bilden. Sie liefern einen Beitrag zur kontinuierlichen Absorption (Abb. 74) und bewirken, daß sich diese auch nach kleineren Wellenzahlen erstreckt.

Die Carbonylbande bei 1742cm^{-1} nimmt mit zunehmender Hydratisierung geringfügig ab. Dies zeigt, daß mit zunehmendem Hydratationsgrad weitere intramolekulare Brücken durch Neutralisation zerstört werden. Jedoch bleibt auch bei 85 %LF noch eine beträchtliche Anzahl derartiger Brücken erhalten.

Die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1228cm^{-1} verschiebt sich mit steigendem Wassergehalt nach 1240cm^{-1} , ein Zeichen dafür, daß die kräftigen $\text{NH}_3^+\cdots\text{OP}$ Brücken aufgebrochen werden und Wasser über schwache Brücken an das Phosphat angelagert wird.

Die $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ Schwingung verschiebt sich mit zunehmendem Hydratationsgrad nach 1411cm^{-1} , was anzeigt, daß intermolekulare $\text{COO}^-\cdots\text{H}^+\text{N}$ Brücken zwischen $(\text{Lys})_n$ und PSE aufgebrochen werden und Wasser über schwache Brücken an die CO_2^- Gruppe gebunden wird.

Mit steigender Luftfeuchtigkeit gewinnt die $\delta(\text{NH}_3^+)$ Absorption des $(\text{Lys})_n$ bei 1520cm^{-1} an Intensität, da zunehmend Protonen zu $(\text{Lys})_n$ übertreten. Die NH_3^+ Gruppierung ist dabei über schwache Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen verknüpft.

3.8.2. Poly-L-Lysin + PSE + LiOH:

Bei vergleichbarer Wasseraufnahme (Bande bei 3400 cm^{-1}) und Struktur der Polyaminosäure wie bei Lys + PSE zeigt das System mit Li^+ eine schwächere $\nu_{\text{as}}(\text{NH}_3^+)$ Absorption im Bereich $3000 - 2700\text{ cm}^{-1}$. Man kann daraus schließen, daß Lysin in etwas geringerem Maß protoniert wird.

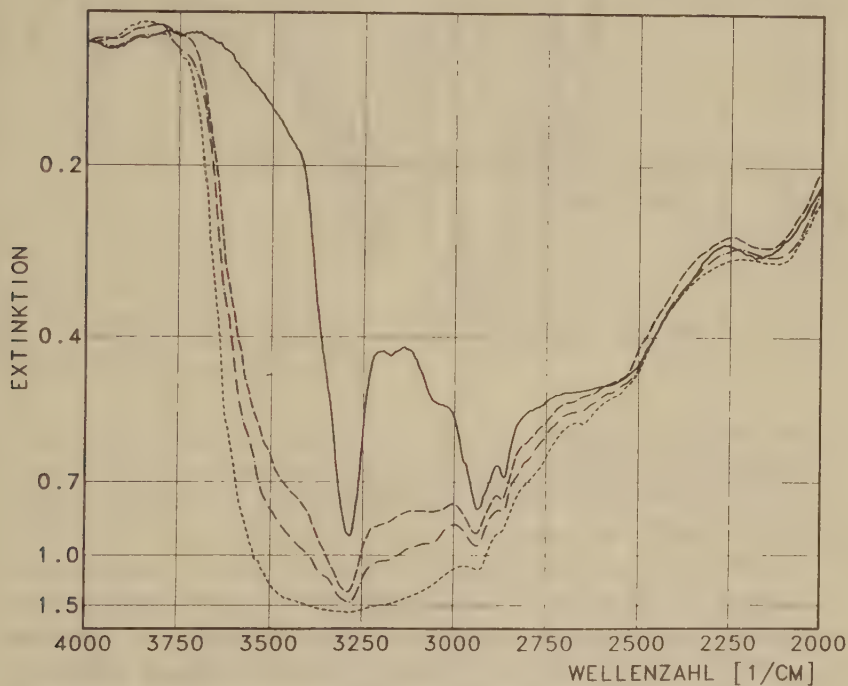


Abb. 62:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

—— 0% LF, ---- 47% LF, - · - · - 57% LF

· · · · · 75% LF

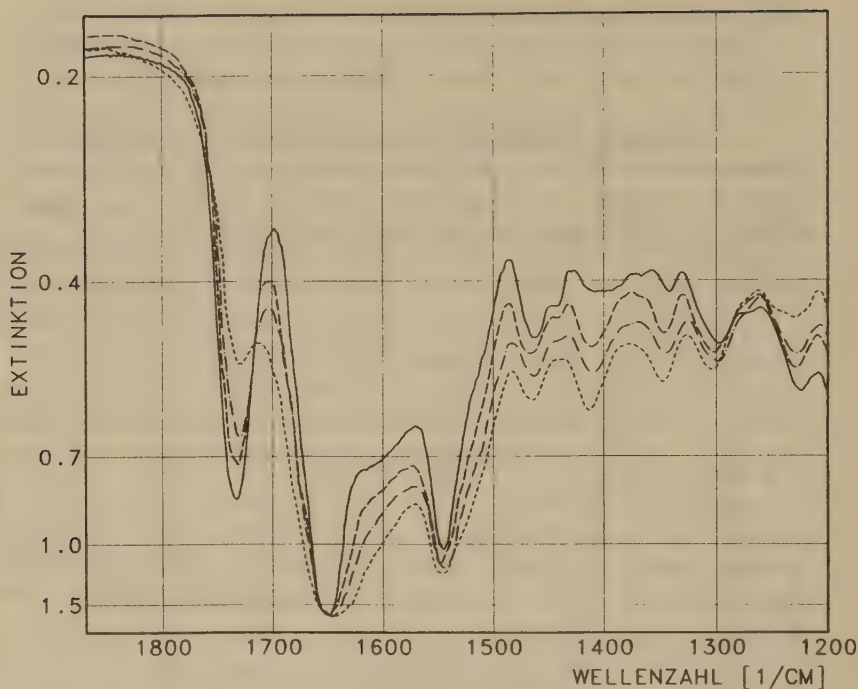


Abb. 63:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

— 0% LF, ---- 47% LF, - · - · - 57% LF

····· 75% LF

Bei 0 %LF findet man die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1733 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Bande als relativ schwache Bande breite Bande bei 1400 cm^{-1} und die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1231 cm^{-1} . Die $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Schwingung ist andeutungsweise bei 925 cm^{-1} zu beobachten. Die Intensitäten dieser Banden zeigen, daß das $\text{COOH} \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Gleichgewicht stärker auf der linken Seite liegt als im System $(\text{Lys})_n + \text{PSE}$ d.h. ohne LiOH. Hiernach ist die Protonenpolarisierbarkeit dieser Brücke kleiner, was die geringere Intensität der kontinuierlichen Absorption im Bereich $3000 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ erklärt (Abb. 74).

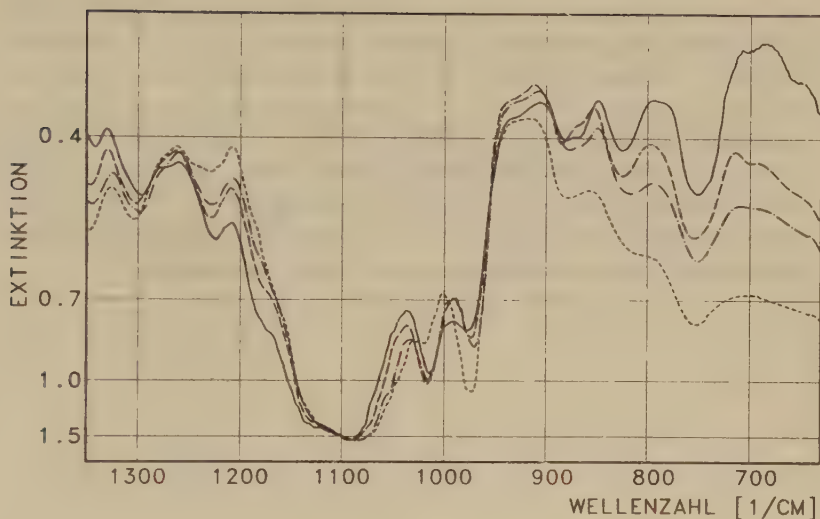


Abb. 64:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

—— 0% LF, ---- 47% LF, - · - · - 57% LF

····· 75% LF

Im Hinblick auf die Intensität der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Schwingung stammen die Protonen, die an das $(\text{Lys})_n$ angelagert werden, bei 0 %LF nur zu einem sehr geringen Anteil von einer Deprotonierung der intramolekularen Brücke. Man findet bei 1020 cm^{-1} eine intensive $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung, was anzeigt, daß ein beträchtlicher Teil der NH_3^+ Gruppen des PSE neutralisiert wird. Diese Protonen werden einerseits zur Neutralisierung des OH^- , zum anderen zur Protonierung des $(\text{Lys})_n$ verwendet. Die kontinuierliche Absorption, insbesondere bei kleineren Wellenzahlen, ist demnach auch hier durch $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken verursacht. Zudem sind sicher auch H_3O_2^- Gruppen an der kontinuierlichen Absorption beteiligt.

Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Absorption bei 1733 cm^{-1} (0 %LF) verliert mit zunehmender Hydratisierung sehr beträchtlich an Intensität, während die $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1630 cm^{-1} , überlagert von der Amid I Schwingung bei 1650 cm^{-1} , und die $\nu_{\text{s}}(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1413 cm^{-1} an Intensität gewinnen. Hiernach wird mit zunehmender Hydratisierung ein gewisser Teil der intramolekularen Brücken durch Neutralisation zerstört. Andererseits verliert die $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung bei 1016 cm^{-1} an Intensität und die $\nu(\text{C}-\text{NH}_3^+)$ Schwingung bei 975 cm^{-1} wird wieder intensiver. Dies zeigt, daß mit zunehmendem Hydratationsgrad ein beträchtlicher Anteil der Aminogruppe des PSE wieder reprotoniert wird.

3.8.3. Poly-L-Lysin + PSE + NaOH:

Man findet bei 0 %LF die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1735 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1220 cm^{-1} und die $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande bei 930 cm^{-1} . Im Hinblick auf die Intensität dieser Banden ist das Gleichgewicht der $\text{COOH}\cdots\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^-\cdots\text{HOP}$ Brücke relativ stark auf

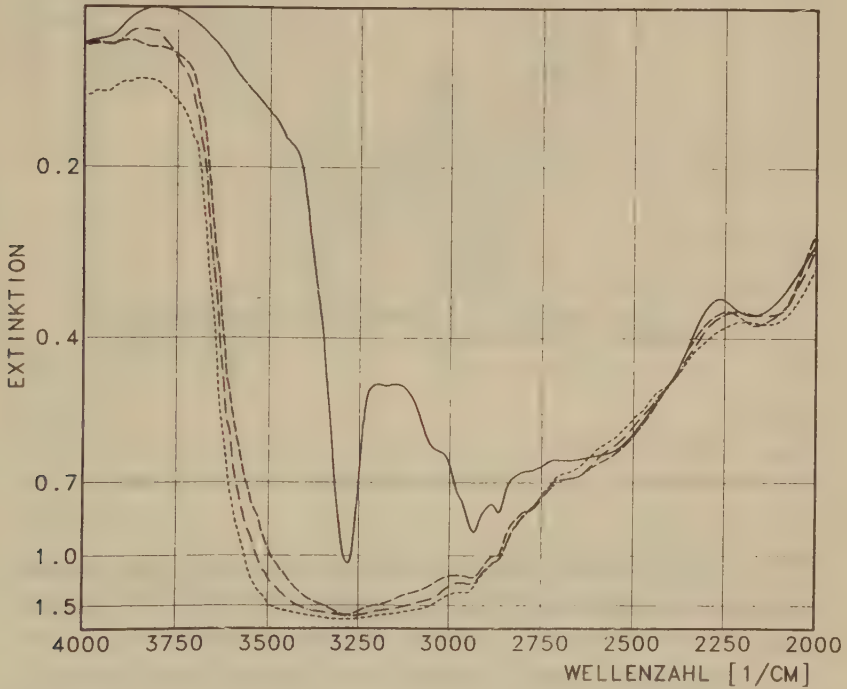


Abb. 65:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$

——— 0% LF, ---- 47% LF, - · - · - 57% LF

····· 75% LF

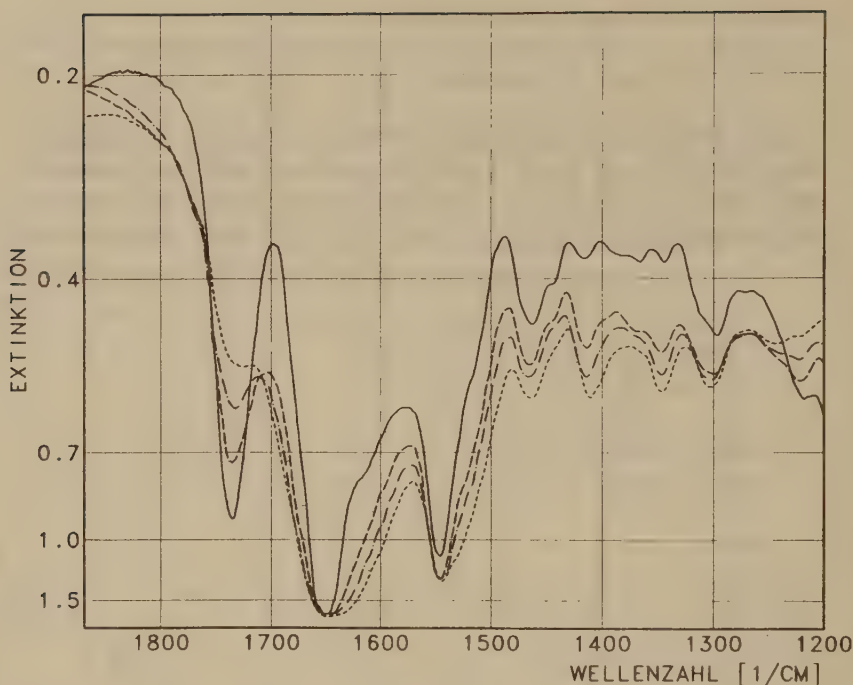


Abb. 66:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$

———— 0% LF, ———— 47% LF, - - - - - 57% LF

..... 75% LF

die linke Seite verschoben. Die Brücke zeigt noch große Protonenpolarisierbarkeit und trägt zur kontinuierlichen Absorption im Bereich $3000 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ bei (Abb. 75).

Bei 0 %LF ist die Protonierung der Lysin-Seitengruppe bei Anwesenheit von Na^+ stärker als im vergleichbaren System mit Li^+ , wie aus der $\nu(\text{NH}_3^+)$ Bande bei $3000 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ zu ersehen ist. Die zur Neutralisation des OH^- erforderlichen Protonen stammen teilweise von der NH_3^+ Gruppe des PSE. Das geht aus der $\nu(\text{C}-\text{NH}_2)$ Schwingung hervor, die als schwache Schulter bei 1030 cm^{-1} zu beobachten ist. Mit zunehmendem Hydratationsgrad wird die intramolekulare Brücke im PSE Molekül zunehmend durch Neutralisation zerstört,

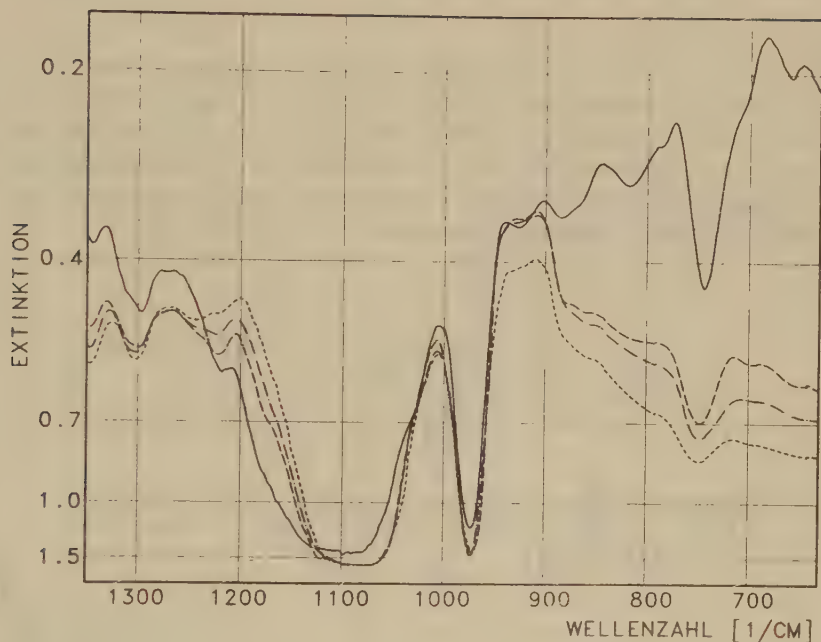


Abb. 67:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$

— 0% LF, --- 47% LF, - · - · - 57% LF

· · · · · 75% LF

wie die starke Abnahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1735 cm^{-1} und die Intensitätszunahme der $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} anzeigt. Die Schulter bei 1030 cm^{-1} verschwindet, d.h. die Aminogruppe des PSE wird wieder protoniert.

Die kontinuierliche Absorption (Abb. 75) wird, wie insbesondere die Intensitätszunahme im Bereich $1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ zeigt, durch $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \cdots \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit verursacht. Die Anzahl derartiger Brücken nimmt mit zunehmendem Hydratationsgrad zu. Daneben könnten auch H_3O_2^- Gruppen zur kontinuierlichen Absorption beitragen.

3.8.4. Poly-L-Lysin + PSE + KOH:

Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande findet man bei 1735 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1228 cm^{-1} und schließlich die $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande bei 930 cm^{-1} . Hiernach ist das Gleichgewicht in der intramolekularen Brücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit weitgehend auf die Seite der $\text{COOH}\cdots^- \text{OP}$ Struktur verschoben.

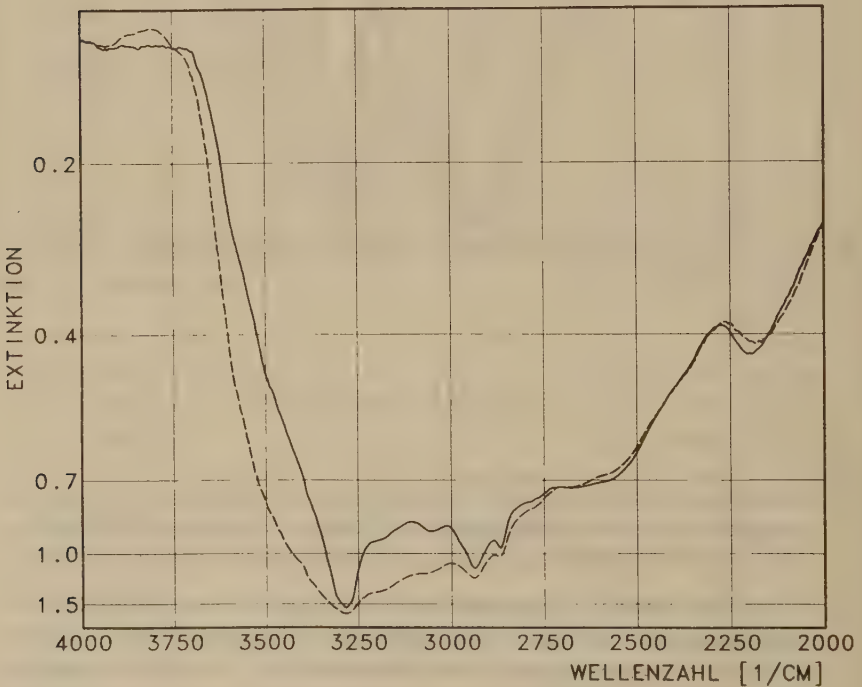


Abb. 68:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$

— 11 %LF, --- 29% LF

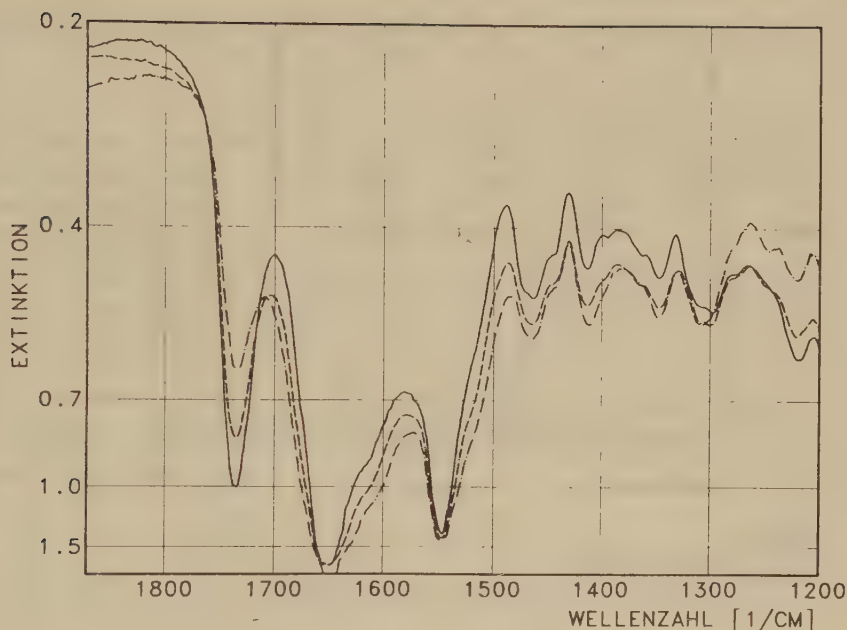


Abb. 69:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$

————11 %LF, -----29% LF, -.-.-.-44% LF

Die $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} ist bei 11 %LF, verglichen mit der $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande, kräftig. Dies zeigt, daß bereits bei 11 %LF ein beträchtlicher Anteil der intramolekularen Brücken durch Neutralisation zerstört ist. Die $\nu(\text{NH}_3^+)$ Absorption der Lysin Gruppen im Bereich $3000 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ ist kräftiger als beim NaOH System.

Die Filme nehmen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit wesentlich rascher Wasser auf als bei Anwesenheit anderer Kationen. Es lassen sich keine Filme mit Luftfeuchtigkeiten größer als 44 % untersuchen, da die Filme flüssig werden. Bei 44 %LF hat die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1735 cm^{-1} bereits stärker abgenommen als bei Zugabe anderer Hydroxide. Das zeigt, daß die intramolekulare Brücke zunehmend durch Neutralisation zerstört wird. Die Zunahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich $1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ zeigt, daß sich auch in diesem System

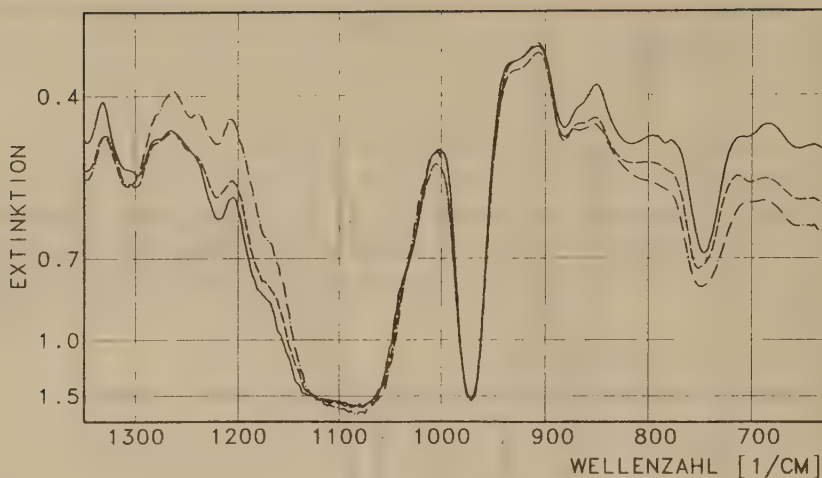


Abb. 70:

(Lys)_n + PSE + KOH

———11% LF, ----29% LF, -.-.-44% LF

$\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit bilden (Abb. 76).

Bei Anwesenheit von KOH wurde in den Filmen mit PSE bzw. (His)_n + PSE eine Aufspaltung der Carbonylbande beobachtet. Im Gegensatz dazu wird hier die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1735 cm^{-1} mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nicht aufgespalten, was darauf schließen läßt, daß keine intramolekularen Brücken des PSE aufgebrochen werden.

3.8.5. Poly-L-Lysin + PSE + Ca(OH)_2

Die Amid A Bande bei 3276 cm^{-1} zeigt, daß Poly-L-Lysin in α -Helix Konformation vorliegt. Diese Struktur verändert sich mit zunehmendem Wassergehalt des Filmes nicht.

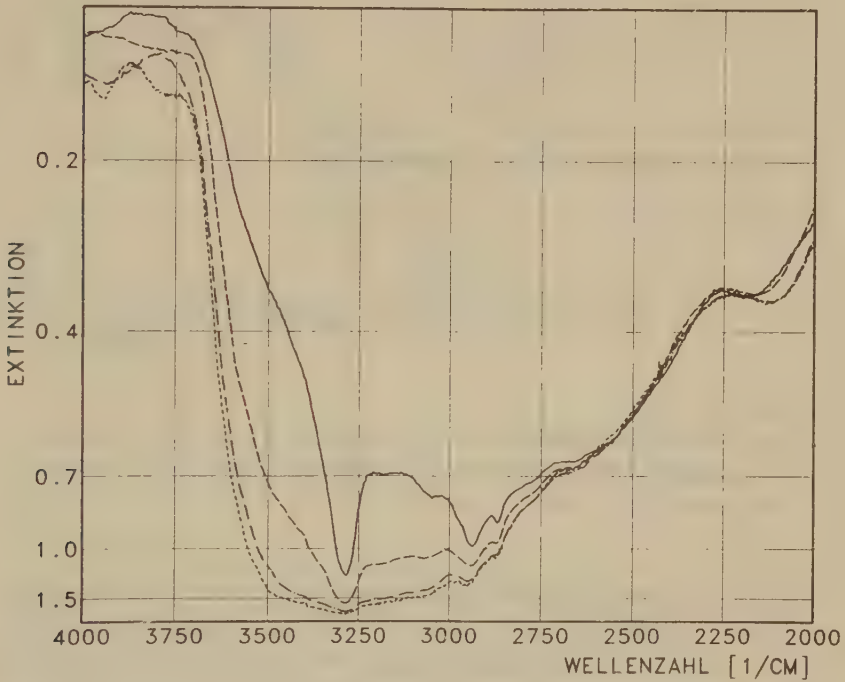


Abb. 71:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{Ca(OH)}_2$

— 0% LF, - - - 47% LF, ···· 75% LF

····· 85% LF

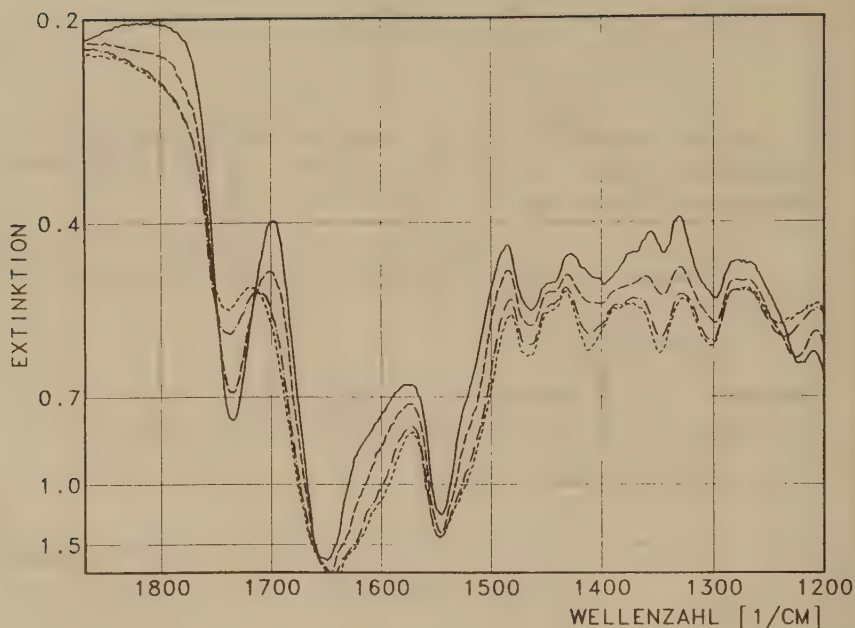


Abb. 72:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{Ca}(\text{OH})_2$

— 0% LF, --- 47% LF, - · - · - 75% LF
 · · · · · 85% LF

Die $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande findet man bei 1734 cm^{-1} , $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ als verbreiterte Bande bei 1400 cm^{-1} , die $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Bande bei 1220 cm^{-1} und die sehr schwache $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande bei 930 cm^{-1} . Dies zeigt, daß das Gleichgewicht in der intramolekularen Brücke nahezu vollständig auf der Seite der $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP}$ Struktur liegt.

Die bei 0 %LF im Vergleich zu anderen Lysinfilmen geringere Intensität der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande sowie die nur noch als Schulter zu beobachtende $\nu(\text{P}-(\text{OH}))$ Bande weisen darauf hin, daß bereits im getrockneten Film eine beträchtliche Anzahl der intramolekularen Brücken durch Deprotonierung zerstört ist. Mit

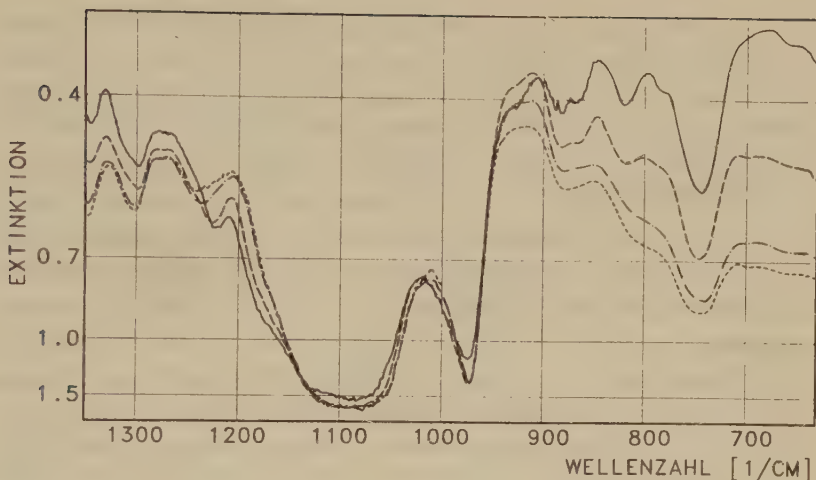


Abb. 73:

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{Ca}(\text{OH})_2$

———— 0% LF, ---- 47% LF, - · - · - 75% LF

····· 85% LF

zunehmender Luftfeuchtigkeit beobachtet man eine weitere Abnahme der Intensität dieser Banden sowie eine Zunahme der $\nu_s(\text{CO}_2^-)$ Bande bei 1410 cm^{-1} (85 % LF), d.h. es werden weitere intramolekulare Brücken durch Neutralisation zerstört.

Eine Verschiebung der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Absorption von 1220 cm^{-1} (0 % LF) nach 1242 cm^{-1} (85 % LF) zeigt, daß mit steigendem Wassergehalt des Filmes die starken intermolekularen $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücken aufgebrochen werden. Diese werden durch schwächere Brücken zu Wassermolekülen ersetzt

Dies wird durch eine Zunahme der Schulter bei 1520 cm^{-1} ($\delta(\text{NH}_3^+)$) mit zunehmender Hydratation des Filmes bestätigt. Darüberhinaus zeigt die Schulter, daß mit zunehmender Luftfeuchtigkeit weitere NH_2 Seitengruppen des Lysin protoniert werden. Es bilden sich $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \cdots \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit aus. Dies äußert sich in einer Zunahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich $1900 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 77).

Hiernach tragen bei kleinem Hydratationsgrad die intramolekularen Wasserstoffbrücken des PSE beträchtlich zur kontinuierlichen Absorption bei. Ihr Beitrag nimmt mit zunehmender Hydratisierung ab. Dafür liefern bei höherem Wassergehalt des Filmes $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ Brücken zwischen $(\text{Lys})_n$ Seitengruppen und möglicherweise auch H_3O_2^- Gruppierungen einen erhöhten Beitrag zur kontinuierlichen Absorption.

Bedingt durch die schwächere Basizität des Ca^{2+} Ions ist die Intensitätsabnahme der $\nu(\text{C}=\text{O})$ Bande bei 1734 cm^{-1} etwas geringer als in den vergleichbaren Na^+ und K^+ Systemen.

3.9. Übersicht über die Poly - L - Lysin Systeme

Konformation der Polyamino-säure:

Die Aminogruppe des Lysin ist in allen Systemen zum Teil protoniert. Wie aus der $\nu_{as}(\text{NH}_3^+)$ Absorption im Bereich $3000 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen ist, nimmt der Protonierungsgrad des $(\text{Lys})_n$ bei getrockneten Filmen in der Reihe $\text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{kein Kation} > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ ab (Abb. 74 - 77).

Protoniertes Lysin liegt bei hoher Luftfeuchtigkeit normalerweise in 100 % antiparalleler β - Faltblattstruktur vor (Lit. 87,88). Auch in Lysin - Phosphat Systemen wurde mit zunehmender Hydratisierung eine Verschiebung des Gleichgewichts von α - Helix zu β - Faltblattstruktur beobachtet (Lit. 87).

Im Gegensatz dazu stellt man hier bei allen untersuchten Systemen α - Helix Struktur fest, die sich auch mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nicht verändert. Die Auswertung der Amid I Bande gibt Anlaß zu dieser Interpretation, da eine Verschiebung dieser Bande von 1654 cm^{-1} zu 1629 cm^{-1} mit einer Schulter bei 1692 cm^{-1} (β - Faltblattstruktur) trotz Überlagerung der Bande mit PSE - Schwingungen zu beobachten wäre.

Dies ist insofern verwunderlich, da man allgemein annimmt (Lit. 83), daß bei Ausbildung von Wasserstoffbrücken oder einer elektrostatischen Wechselwirkung mit der protonierten Aminogruppe des Lysin die antiparallele β - Faltblattstruktur begünstigt gebildet wird. (Lit. 89).

Wasseraufnahme der Filme:

Alle Filme nehmen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit relativ viel Wasser auf. Ebenfalls bei allen Systemen treten Banden im Bereich um 2600 und 2150 cm^{-1} auf, die durch Ober- bzw. Kombinationsschwingungen hervorgerufen werden, was auf starke Wasserstoffbrücken in diesen Systemen hinweist (Lit. 90-93).

Kontinuierliche Absorption:

Ebenfalls ein Indiz für struktursymmetrische Wasserstoffbrücken ist das Auftreten einer kontinuierlichen Absorption (Abb. 74 - 77). Bei den getrockneten Systemen findet man eine intensive kontinuierliche Absorption über den gesamten Meßbereich, die sich von 3000 cm^{-1} zu kleineren Wellenzahlen hin erstreckt.

$(\text{Lys})_n + \text{PSE}$

Die Seitengruppen der Polyaminosäure sind teilweise protoniert. Man beobachtet das Auftreten einer kontinuierlichen Absorption im Bereich größerer Wellenzahlen (Abb. 74). Das läßt darauf schließen, daß noch ein beträchtlicher Teil der intramolekularen $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP}$ Wasserstoffbrücken ausgebildet ist.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit nimmt die Intensität der Carbonylbande geringfügig ab, d.h. es werden weitere intramolekulare Wasserstoffbrücken durch Neutralisation zerstört. Die Intensitätszunahme der $\nu(\text{NH}_3^+)$ Bande im Bereich $3000 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ und der $\delta(\text{NH}_3^+)$ bei 1520 cm^{-1} Bande zeigt an, daß mit der Hydratisierung des Filmes weitere Lysin-Seitengruppen protoniert werden. Dabei bleibt die α -Helix Konformation der Polyaminosäure erhalten.

$(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$:

Bei Anwesenheit von Lithium ist die Aminogruppe des Lysin in deutlich geringerem Maße deprotoniert als im $(\text{Lys})_n + \text{PSE}$ System.

Das Gleichgewicht der intramolekularen $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Brücke ist stark zugunsten der Carbonsäurestruktur verschoben. Trotzdem ist eine intensive kontinuierliche Absorption zu beobachten, die sich über den gesamten Meßbereich erstreckt (Abb. 74).

Aus der Intensität der $\nu(\text{C}-\text{N})$ Schwingungen geht hervor, daß die Aminogruppe des PSE zum größten Teil deprotoniert vorliegt. Damit ist die kontinuierliche Absorption auch durch $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit verursacht.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ist die intramolekulare $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP}$ Brücke in einem beträchtlichen Ausmaß durch Deprotonierung zerstört. Die Aminogruppe des PSE wird bei hohen Luftfeuchtigkeiten (75 %) wieder zu einem großen Teil reprotoniert. Da mit dem Aufbrechen der intramolekularen $\text{COOH} \cdots ^-\text{OP}$ Brücke gleichzeitig $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ Brücken gebildet werden, ist nahezu keine Veränderung der kontinuierlichen Absorption mit zunehmender Hydratation zu beobachten.



Wie schon beim Lithium System zu beobachten, sind auch hier im getrockneten Film die intramolekularen Wasserstoffbrücken noch zum großen Teil erhalten. Sie tragen zu der intensiven kontinuierlichen Absorption im Bereich großer Wellenzahlen bei. Einige NH_3^+ Gruppen des PSE sind neutralisiert. Damit bilden sich $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken, die ebenfalls zur kontinuierlichen Absorption beitragen. Anders als beim Lithiumfilm ist jedoch die Aminogruppe des PSE nur in sehr geringem Ausmaß deprotoniert. Ferner spielen vermutlich noch anwesende H_3O_2^- Gruppen für das Auftreten der kontinuierlichen Absorption eine wesentliche Rolle.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit werden die intramolekularen Brücken nahezu vollständig durch Deprotonierung zerstört. Die freiwerdenden Protonen werden teilweise zur Neutralisation von NaOH benutzt, teilweise werden Seitengruppen des $(\text{Lys})_n$ protoniert.

Dies macht sich in einer Intensitätszunahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich $1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ bemerkbar, die von $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit verursacht wird (Abb. 75).



In den Filmen bei 11 %LF ist die intramolekulare Wasserstoffbrücke noch teilweise erhalten. Das Gleichgewicht ist vollständig auf die Seite der Carbonsäuregruppierung verschoben. Im Vergleich zum Natrium-System sind etwas mehr intramolekulare Wasserstoffbrücken durch Neutralisation zerstört, gleichzeitig ist die Polyaminosäure in einem größeren Ausmaß protoniert. Somit ist auch die kontinuierliche Absorption, die sich über den gesamten Meßbereich erstreckt, in einem beträchtlichen Ausmaß von $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit verursacht (Abb. 76).

Mit zunehmender Hydratisierung wird die intramolekulare Brücke durch Deprotonierung zerstört. Die Wasseraufnahme des Filmes und die Deprotonierung dieser Brücke in Abhängigkeit von der rel. Luftfeuchtigkeit ist beim Kalium - Film weitaus stärker ausgeprägt als bei den Filmen mit anderen Kationen.

Die Filme wurden bereits bei Luftfeuchtigkeiten größer als 44 % flüssig.



Im getrockneten Film findet man noch einen beträchtlichen Anteil intramolekularer Wasserstoffbrücken. Das Gleichgewicht ist fast vollständig auf die Seite der $\text{COOH} \cdots \text{OP}$ Struktur verschoben. Trotz des unsymmetrischen Potentials dieser Wasserstoffbrücke beobachtet man eine starke kontinuierliche Absorption im Bereich $3000 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 77). $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken bewirken eine kontinuierliche Absorption, die sich von 3000 cm^{-1} über den gesamten Bereich zu kleineren Wellenzahlen erstreckt. Ein Teil dieser Absorption ist von H_3O_2^- Brücken verursacht, die sich durch Wasseranlagerung an $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ausbilden.

Mit zunehmender Luftfeuchtigkeit steigt der Wassergehalt des Ca^{2+} Filmes weniger als in den anderen Systemen an. Man beobachtet, daß einige intramolekulare Wasserstoffbrücken durch Neutralisation zerstört werden. Die Zunahme der kontinuierlichen Absorption im Bereich $1900 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ ist in zunehmendem Maß von $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit verursacht.

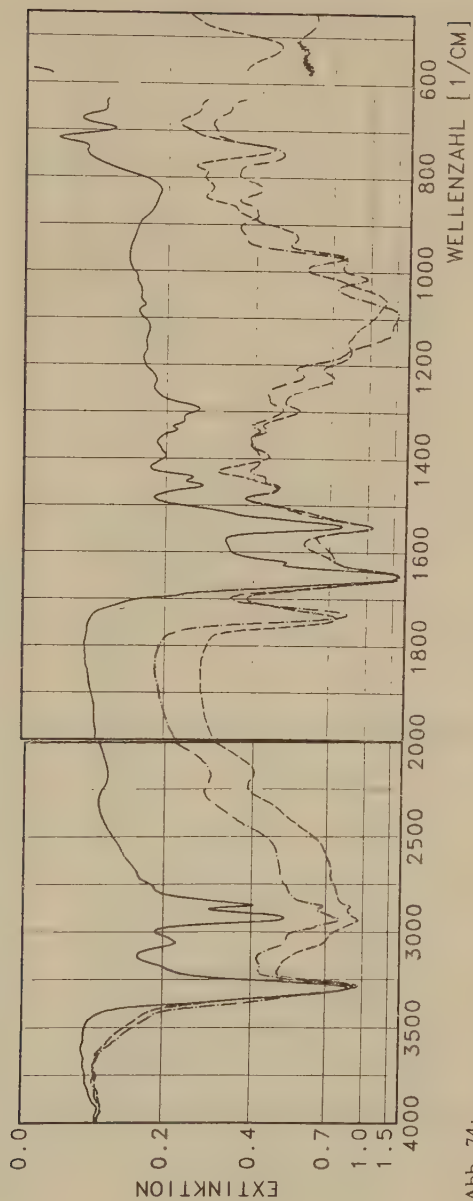


Abb. 74:

$(\text{Lys})_n$ - Spektren bei 0 % LF:

— $(\text{Lys})_n$, --- $(\text{Lys})_n + \text{PSE}$, - · - · - $(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$

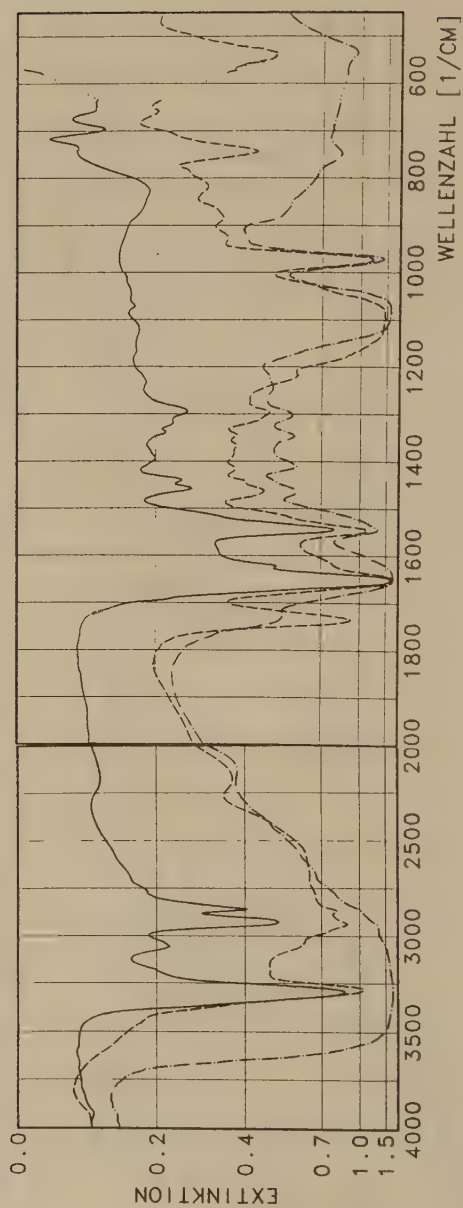
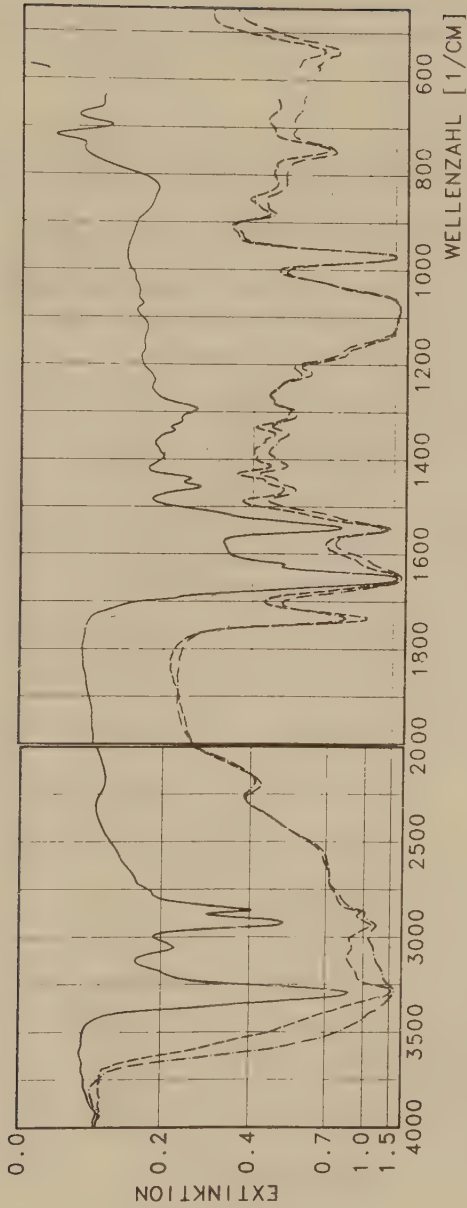


Abb. 75:

— $(Lys)_n$ (0 % LF), - - - $(Lys)_n + PSE + NaOH$ (0 % LF)
 - · - $(Lys)_n + PSE + NaOH$ (75 % LF)



Abt. 76:

— (Lys)_n (0 % LF), - - - - (Lys)_n + PSE + KOH (11% LF)
 - · - · (Lys)_n + PSE + KOH (29 % LF)

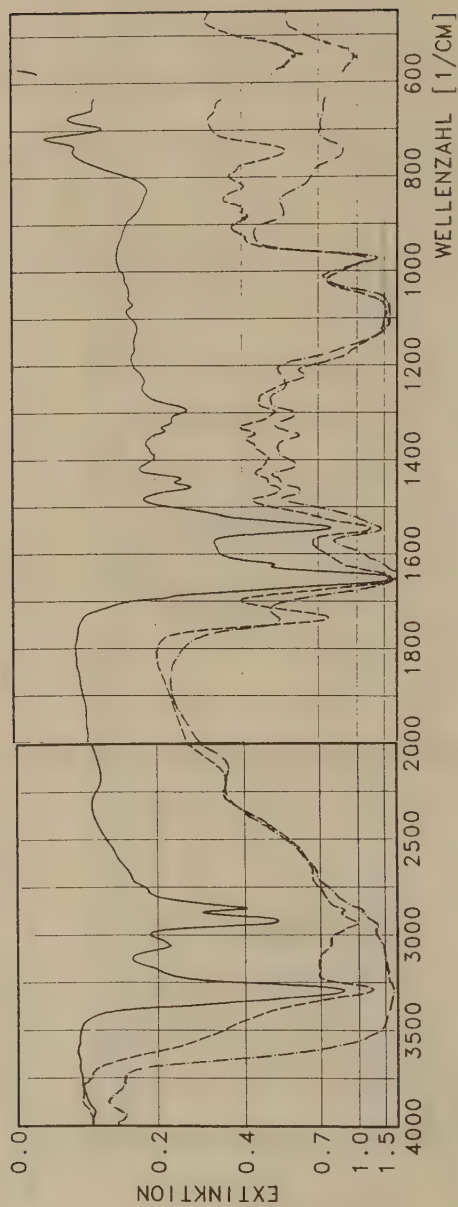


Abb. 77:
 — $(\text{Lys})_n$ (0 % LF), - - - - $(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{Ca(OH)}_2$ (0 % LF)
 - - - - $(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{Ca(OH)}_2$ (85 % LF)

3.10. Vergleich mit den Poly - L - Glutaminsäure + PSE Systemen

Dieses System wurde bereits von Kempf (Lit. 19) untersucht und soll hier nur kurz in einer Gegenüberstellung betrachtet werden.

Es treten keine Wasserstoffbrücken zwischen PSE und der Carbonsäuregruppe der Glutaminsäure auf.

Bei Anwesenheit von Kationen ist die Glutaminsäure deprotoniert, dabei beobachtet man mit zunehmender Hydratisierung eine Umwandlung der Sekundärstruktur von α - Helix nach β - Faltblatt (deprotoniert). Während bei Ca^{2+} der Grad der Deprotonierung, unabhängig vom Wassergehalt des Filmes, konstant bei 50% liegt, nimmt er bei den anderen Kationen über Li^+ , Na^+ und K^+ (entsprechend der Basenstärke der Hydroxide) deutlich zu.

Die zugegebenen Kationen in Form von Hydroxiden deprotonieren ausschließlich die Carbonsäuregruppe der Poly - L - Glutaminsäure. Dies läßt vermuten, daß im PSE System kräftige intra - und intermolekulare Wasserstoffbrücken ausgebildet sind, die eine Deprotonierung wirkungsvoll verhindern.

Beim Hydratisieren wird die Glutaminsäure noch weiter deprotoniert, man erreicht bei Na^+ und K^+ im hydratisierten Film nahezu 100 % Deprotonierung.

5. Zusammenfassung:

Im biologischen Geschehen ist die Wechselwirkung von Proteinen mit Membranen von essentieller Bedeutung. In diesem Zusammenhang spielt die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Proteinseitengruppen und den polaren Phospholipid-Kopfgruppen eine wichtige Rolle. Diese Wechselwirkung wurde mithilfe der Infrarot-Spektroskopie untersucht. Bei der Komplexität biologischer Systeme erschien es ratsam, sich mit Modellmolekülen zu beschäftigen, die es erlauben, gezielt die Wechselwirkung einzelner Molekülgruppen zu betrachten.

Ein Modellmolekül für die polare Kopfregion des Phosphatidylserin, O-Phospho-L-serin-P-ethylester (PSE), wurde synthetisiert. Dieses Modellmolekül unterscheidet sich vom biologischen Vorbild insoweit, als der Lipidrest, das Diacylglycerin, durch eine Ethylgruppe ersetzt ist.

Durch Einsatz von Polyaminosäuren ist es möglich, die Wechselwirkung des Phospholipidkopfes mit definierten Proteinseitengruppen zu beobachten. Als Modellsysteme wurden Poly-L-Histidin und Poly-L-Lysin gewählt, Poly-L-Glutaminsäure wurde mit derselben Zielsetzung bereits untersucht (Lit. 19).

Alle Substanzen wurden in Form von Filmen vermessen, die aus wässriger Lösung durch Zentrifugation im Vakuum auf einem Probenträger niedergeschlagen wurden. Durch Zugabe von Li^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} als Hydroxide in stöchiometrischen Mengen konnte einerseits der Kationeneinfluß auf die Protein-Phospholipid Wechselwirkung simuliert werden andererseits wurde geklärt, welche Gruppierungen durch die OH^- Ionen deprotoniert werden. Des weiteren wurden alle Filme bei definiertem Wasserdampfpartialdruck hydratisiert, um so den Einfluß von Wasser zu ermitteln.

O-Phospho-L-serin-P-ethylester (PSE):

PSE liegt in einer Konformation vor, bei der sich gleichzeitig zwei Wasserstoffbrücken, eine intramolekulare



Brücke mit großer Protonenpolarisierbarkeit zwischen der Carbonsäure- und der

Phosphatgruppe, sowie eine intermolekulare $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücke zwischen der Aminogruppe des Serinrestes und der Phosphatgruppe eines benachbarten PSE, ausbilden können (Abb. 15). Die IR - Spektren zeigen, daß zwischen 44 und 57 % Luftfeuchtigkeit eine Konformationsänderung des Systems eintritt, wobei an der intermolekularen $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücke stark gebundenes Wasser (Strukturwasser) angelagert wird. Dieses ist an NH_3^+ und PO_2^- gebunden, die intermolekulare Brücke wird dabei nicht aufgebrochen. Erst bei einer Luftfeuchtigkeit über 85 % bricht die intermolekulare $\text{NH}_3^+ \cdots \text{OP}$ Brücke zwischen benachbarten PSE Molekülen auf.

Kationeneinfluß:

Bei Zugabe von LiOH wird im getrockneten Film (11 %LF) und mit zunehmender Luftfeuchtigkeit bevorzugt die NH_3^+ Gruppe deprotoniert. Erst bei sehr hoher Luftfeuchtigkeit wird diese Gruppe wieder reprotoniert. Bei kleinem Hydratationsgrad sind nur relativ wenige intramolekulare $\text{COOH} \cdots \text{OP}$ Brücken durch Deprotonierung zerstört. Mit zunehmendem Hydratationsgrad nimmt die Anzahl der zerstörten Brücken zu.

Bei Anwesenheit von Natriumionen ist das $\text{COOH} \cdots \text{OP} \rightleftharpoons \text{COO}^- \cdots \text{HOP}$ Gleichgewicht der intramolekularen Brücke etwas weiter auf die rechte Seite verschoben als beim System mit Li^+ . Die kontinuierliche Absorption zeigt, daß die Wasserstoffbrücke eine größere Protonenpolarisierbarkeit besitzt. Bei 11 %LF sind, ebenso wie beim Li^+ System, etwa 50 % der Brücken durch Neutralisation zerstört. Diese Anzahl nimmt mit zunehmendem Hydratationsgrad zu. Es sind nur wenige NH_3^+ Gruppen deprotoniert.

Beim Kaliumsystem werden beim Übergang von 11 nach 29 %LF nahezu alle NH_3^+ Gruppen deprotoniert. Simultan bricht ein großer Teil der intramolekularen Brücken auf. Bei hoher Luftfeuchtigkeit werden die Aminogruppen reprotoniert und die Carbonsäuregruppen zu einem großen Teil deprotoniert. Die nicht deprotonierten Carbonsäuregruppen bilden wieder eine intramolekulare Brücke, bei der das Gleichgewicht stark zugunsten der Struktur (II) verschoben ist.

Das $\text{Ca}(\text{OH})_2$ vermag weder die NH_3^+ Gruppe zu deprotonieren noch die intramolekulare Wasserstoffbrücke in merklichem Umfang durch Deprotonierung zu zerstören.

Poly - L - Histidin:

Zwischen der Carbonsäuregruppe des PSE und Histidin (in Knäuelstruktur) bilden sich Wasserstoffbrücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit aus, deren Gleichgewicht erst bei erhöhter Luftfeuchtigkeit durch Wasseranlagerung etwas - zugunsten einer Struktur mit protonierten Histidin - verschoben wird.

Bei Anwesenheit von Kationen beobachtet man keine $(\text{His})_n$ - PSE Wasserstoffbrücke, die Polyaminosäure liegt zu 100 % in α - Struktur vor.

Im System $(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{LiOH}$ erfolgt die Deprotonierung sowohl an der NH_3^+ Gruppe als auch an der intramolekularen Brücke des PSE. Soweit die intramolekulare Wasserstoffbrücke noch gebildet ist, hat die Grenzstruktur (II) größeres Gewicht als in den Systemen ohne $(\text{His})_n$. Mit zunehmendem Hydratationsgrad tritt bevorzugt die Deprotonierung der NH_3^+ Gruppe ein.

Demgegenüber wird beim $(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$ System bevorzugt die intramolekulare Brücke durch Deprotonierung zerstört. Der Grad der Deprotonierung ist bei Anwesenheit von $(\text{His})_n$ größer als im System ohne die Polyaminosäure.

Bei $(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$ beobachtet man ein Aufbrechen der intramolekularen Brücken. Der Anteil der aufgebrochenen Brücken ist jedoch im Vergleich zum System ohne Polyaminosäure geringer. Vergleichsweise geringer ist auch das Ausmaß der Deprotonierung der NH_3^+ Gruppe.

Im System $(\text{His})_n + \text{PSE} + 0,5 \text{ Ca}(\text{OH})_2$ wird ausschließlich die intramolekulare Brücke des PSE durch Deprotonierung zerstört. In den noch vorhandenen intramolekularen Brücken wird das Gleichgewicht mit zunehmender Hydratisierung zugunsten der Grenzstruktur (I) verschoben.

Poly - L - Lysin:

Die Polyaminosäure liegt in allen Systemen in α - Helix Konformation vor. Die Konformation bleibt beim Hydratisieren der Filme erhalten.

Beim $(\text{Lys})_n + \text{PSE}$ System beobachtet man, daß die intramolekulare Wasserstoffbrücke weitgehend erhalten ist, wobei die Grenzstruktur (II) ein relativ großes Gewicht besitzt. Die NH_3^+ Gruppe des PSE ist zu einem sehr geringen Teil deprotoniert, es sind einige $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit ausgebildet.

Bei Anwesenheit von LiOH sind noch eine beträchtliche Anzahl intramolekularer Wasserstoffbrücken ausgebildet. Das Gleichgewicht ist stärker zugunsten der Struktur (I) verschoben. Die NH_3^+ Gruppierung des PSE ist zu einem großen Teil deprotoniert, es bilden sich $\text{NH}^+ \cdots \text{N} \rightleftharpoons \text{N} \cdots \text{H}^+ \cdots \text{N}$ Brücken mit großer Protonenpolarisierbarkeit aus. Mit zunehmendem Hydratisierungsgrad nimmt die Deprotonierung der intramolekularen Brücke stark zu, während bei hoher Luftfeuchtigkeit die Aminogruppe des PSE wieder teilweise reprotoniert wird. Die kontinuierliche Absorption wird dann bevorzugt von $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ Brücken verursacht. Die im getrockneten $(\text{Lys})_n + \text{PSE} + \text{NaOH}$ Film noch weitgehend erhaltene intramolekulare Brücke wird mit zunehmendem Hydratationsgrad weitgehend durch Deprotonierung zerstört, während nahezu keine Deprotonierung der NH_3^+ Gruppe des PSE stattfindet. Die bei großem Hydratationsgrad zu beobachtende kontinuierliche Absorption ist bevorzugt von $\text{NH}^+ \cdots \text{N}$ Brücken protonierter $(\text{Lys})_n$ Moleküle verursacht.

Ein mit dem Natriumsystem vergleichbares Verhalten zeigen auch die Filme mit KOH bzw $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Während der Film mit KOH keine Aufspaltung der Carbonylbande zeigt, wie sie in den Systemen $\text{PSE} + \text{KOH}$ bzw. $(\text{His})_n + \text{PSE} + \text{KOH}$ beobachtet wurde, ist beim Film mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ die intramolekulare Brücke bereits im getrockneten System stärker durch Deprotonierung zerstört als bei $(\text{Lys})_n$ Filmen in Anwesenheit anderer Kationen.

5. Literaturverzeichnis

- (1) E. Gorter, F. Grendel, J. Exp. Med. 41, 439 (1925).
- (2) S.J. Singer, G.L. Nicolson, Science 175, 720 (1972).
- (3) J.A. Silvius, J. Gagne, Biochemistry 23, 3232 (1984).
- (4) C.M. Colley, R.F.A. Zwaal, B. Roelofsen, L.L.N. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta 307, 74 (1973).
- (5) J.A.F. Op den Kamp, Ann. Rev. Biochem. 48, 47 (1979).
- (6) C. Scandarella, P. Devaux, H.M. McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2056 (1972).
- (7) H.W. Chang, E. Bock, Biochemistry 18, 172 (1979).
- (8) A.G. Lee, A.P. Smith, Life Sci. 26, 1459 (1980).
- (9) M. Roux, J.M. Neumann, FEBS Letters 199, 33 (1986).
- (10) C. Altenbach, J. Seelig, Biochemistry 23, 3913 (1984).
- (11) F. Borle, J. Seelig, Chem. Phys. Lipids 36, 263 (1985).
- (12) H. Akutsu, J. Seelig, Biochemistry 20, 7366 (1981).
- (13) H. Hauser, G.G. Shipley, J. Biol. Chem. 256, 11377 (1981).
- (14) H.L. Casal, H.H. Mantsch, H. Hauser, Biochemistry 26, 4408 (1987).
- (15) G. Papakostidis, G. Zundel, Z. Naturforsch. 28b 323 (1973).
- (16) J.L. Browning, J. Seelig, Biochemistry 19, 1262 (1980).
- (17) M. Gutman, Method. Enzymol. 127, 522 (1986).
- (18) M.J. Selwyn, Nature 322, 756 (1986).
- (19) I. Kempf, Diplomarbeit Univ. München (1986).
- (20) S.N. Vinogradov, R.A. Hudson, R.M. Scott, Biochim. Biophys. Acta 214, 6 (1970).
- (21) W.M. Latimer, W.H. Rodebush, J. Am. Chem. Soc. 42, 1419 (1920).
- (22) J.W. Ellis, Phys. Rev. 38, 693 (1931).
- (23) N.D. Coggeshall, J. Chem. Phys. 18, 978 (1950).
- (24) N.D. Coggeshall, E.L. Saier, J. Am. Chem. Soc. 73, 5414 (1951).
- (25) R. Suhrmann, F. Breyer, Z. Physik. Chem. Abt. B 23, 193 (1933).
- (26) Th. Ackermann, Z. Physik. Chem. (Frankfurt) 27, 253 (1961).

- (27) G. Zundel in: "The Hydrogen Bond - Recent Developments in Theory and Experiments -", hrsg. von P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy, North Holland Publ. Co., Amsterdam, Vol. II, 683 (1976).
- (28) R.M. Badger, S.H. Bauer, J. Chem. Phys. 5, 605 (1937).
- (29) R.E. Rundle, M. Parasol, J. Chem. Phys. 20, 1487 (1952).
- (30) S.N. Vinogradov, R.H. Linell in: "Hydrogen Bonding", Van Nostrand Reinhold Co., New York (1971).
- (31) G.M. Barrow, J. Am. Chem. Soc. 76, 5211 (1954).
- (32) E.A. Yerger, G.M. Barrow, J. Am. Chem. Soc. 77, 6206 (1955).
- (33) A. Gierer, K. Wirtz, J. Phys. Chem. 56, 914 (1952).
- (34) M. Eckert, G. Zundel, J. Phys. Chem. 91, 5170 (1987).
- (35) P. Schuster, P. Wollschan, K. Tortschanoff in: "Chemical Relaxation in Molecular Biology", hrsg. von I. Pecht, R. Rigler, Springer Verlag, Berlin 107 (1977).
- (36) F. Hund, Z. Physik 43, 805 (1927).
- (37) E.G. Weidemann, G. Zundel, Z. Naturforsch. 25a, 627 (1970).
- (38) R. Janoschek, E.G. Weidemann, H. Pfeiffer, G. Zundel, J. Am. Chem. Soc. 94, 2387 (1972).
- (39) R. Janoschek, E.G. Weidemann, H. Pfeiffer, G. Zundel, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 69, 505 (1973).
- (40) K. Fajans, G. Joos, Z. Physik 23, 1 (1924).
- (41) A. Hayd, E.G. Weidemann, G. Zundel, J. Chem. Phys. 70, 86 (1979).
- (42) N.B. Librovič, V.P. Sakun, N.D. Sokolov, Chem. Phys. 39, 351 (1979).
- (43) K.A. Fisher, W. Stoeckenius in: "Biophysik", Springer Verlag, Berlin, 426 ff. (1984).
- (44) M.B. Abramson, R. Katzmann, C.E. Wilson, H.P. Gregor, J. Biol. Chem. 239, 4066 (1964).
- (45) G. Cevc, A. Watts, D. Marsh, Biochemistry 20, 4955 (1981).
- (46) G. Büldt, R. Wohlgemuth, J. Membrane Biol. 58, 81 (1981).
- (47) T. Shibata, J. Uzawa, Y. Sugiura, Chem. Phys. Lipids 33, 1 (1980).
- (48) M. Elder, P. Hitchcock, R. Mason, G.G. Shipley, Proc. Roy.

- Soc. (London) A 354, 157 (1977).
- (49) K.S. Cheah, J.C. Watkins, J. Med. Pharm. Chem. 8, 821 (1965).
- (50) G. Papakostidis, Dissertation München (1972).
- (51) B. Brzezinski, in Vorbereitung.
- (52) A. Patchornik, A. Berger, E. Katchalski, J. Am. Chem. Soc. 79, 5227 (1957).
- (53) E. Katchalski, N. Shavit, H. Eisenberg, J. Polym. Sci. 13, 69 (1954).
- (54) R.H. Stokes, R.A. Robinson, Ind. Eng. Chem. 41, 2013 (1949).
- (55) E. Obermüller, Diplomarbeit München (1981).
- (56) D. Papahadjopoulos, Cell Surf. Rev. 5, 765 (1978).
- (57) P.F. Devaux, M. Seigneuret, Biochim. Biophys. Acta 822, 63 (1985).
- (58) D. Atkinson, H. Hauser, G.G. Shipley, J.M. Stubbs, Biochim. Biophys. Acta 339, 10 (1974).
- (59) G.W. Stockton, C.F. Polnaszek, A.T. Tulloch, F. Hasan, I.C.P. Smith, Biochemistry 15, 954 (1976).
- (60) J.M. Boggs, L.S. Chia, G. Rangaraj, M.A. Moscarello, Chem. Phys. Lipids 39, 165 (1986).
- (61) H. Hauser, Biochem. Biophys. Acta 772, 37 (1984).
- (62) K. Arnold, R. Pausch, J. Frenzel, E. Winkler, Studia Biophysica Berlin 51-2, 81 (1975).
- (63) H. Hauser, E.G. Finer, A. Darke, Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 267 (1977).
- (64) A. Portis, C. Newton, W. Pangborn, D. Papahadjopoulos, Biochemistry 18, 780 (1979).
- (65) R.J. Kurland, M. Hannoudah, S. Nir, D. Papahadjopoulos, Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 927 (1979).
- (66) U.P. Fringeli, H. Gunthard in: "Membrane Spectroscopy", hrsg. von E. Grell, Springer Verlag, New York, 270 (1981).
- (67) R.H. Dluhy, D.G. Cameron, H.H. Mantsch, R. Mendelsohn, Biochemistry 22, 6318 (1983).
- (68) H.L. Casal, H.H. Mantsch, F. Paltauf, H. Hauser, Biochim. Biophys. Acta 919, 275 (1987).
- (69) H. Brockmann, H. Musso, Chem. Ber. 89, 241 (1956).

- (70) D. Hadži, N. Sheppard, Proc. Roy. Soc. 216, 247 (1953).
- (71) L.J. Bellamy, The Infrared Spectra of Complex Molecules, Chapman and Hall, London (1975).
- (72) D.E.C. Corbridge, J. Appl. Chem. 6, 456 (1956).
- (73) D. Hadži, S. Bratož in: "The Hydrogen Bond - Recent Developments in Theory and Experiments -", hrsg. von P. Schuster, G. Zundel, C. Sandorfy, North Holland, Amsterdam, Vol. 2, 565 (1976).
- (74) H. Lindemann, Dissertation, München (1970).
- (75) L.C. Thomas, R.A. Chittenden, Spectrochim. Acta 20, 489 (1964).
- (76) J.E. Stewart, J. Chem. Phys. 30, 1259 (1959).
- (77) L.C. Thomas, R.A. Chittenden, Spectrochim. Acta 26a, 781 (1970).
- (78) H. Akutsu, M. Ikematsu, Y. Kyogoku, Chem. Phys. Lipids 28, 149 (1981).
- (79) D. Vollhardt, M. Wittig, J.G. Petrov, G. Malecki, J. Colloid Interface Sci. 106, 28 (1958).
- (80) L.J. Bellamy, L. Beecher, J. Chem. Soc. 1701 (1952).
- (81) T. Miyazawa in: "Poly- α -Amino-Acids, Polypeptides and Proteins", hrsg. von M. Stahmann, The University of Wisconsin Press, Madison 201 (1962).
- (82) T. Miyazawa, E.R. Blout, J. Am. Chem. Soc. 83, 712 (1961).
- (83) J.A. Schellman, C. Schellman in: "The Proteins - Composition, Structure and Function-", hrsg. von H. Neurath, Academic Press, New York, Vol. II, 1 (1964).
- (84) W. Kauzmann, Ann. Rev. Phys. Chem. 8, 413 (1957).
- (85) E.V. Brazhnikov, Y.N. Chirgadse, J. Mol. Biol. 122, 127 (1978).
- (86) Y.N. Chirgadse, E.V. Brazhnikov, N.A. Nevskaya, J. Mol. Biol. 102, 781 (1976).
- (87) U. Burget, Dissertation München (1985).
- (88) W. Mühlinghaus, Dissertation, München (1970).
- (89) W. Kristof, Dissertation München (1979).
- (90) D. Hadži, N. Kobilarov, J. Chem. Soc. A, 439 (1966).
- (91) M.F. Claydon, N. Sheppard, Chem. Commun., 1431 (1969).
- (92) G. Zundel in: "Hydration and Intermolecular Interactions", Academic Press, New York, (1969).

- (93) J.T. Brauholtz, G.E. Hall, F.G. Mann, N. Sheppard, J. Chem. Soc.
868 (1959).

Lebenslauf:

Name:	Nikolaus Johann Leberle	
Geburtsdatum:	8.1.1956	
Geburtsort:	München	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Eltern:	Felix Leberle, kaufm. Angestellter und Frau Kunigunde, geb. Becher	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1962 - 1966	Volksschule in München
	1966 - 1975	Pestalozzi - Gymnasium, München
	1975	Abitur
Hochschule:	1975 - 1982	Studium der Chemie an der Ludwig - Maximilians - Universität München
	1982	Diplom
	seit 1.9.1982 Anfertigung einer Dissertation bei Prof.Dr. G. Zundel am physikalisch - chemischen Institut der Universität München	

FOTODRUCK J. MAINZ GmbH
Neupforte 13, Nähe Markt, D-5100 Aachen
Telefon: (0241) 27305 und (0241) 38606